

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

Využití monosubstituovaných
cyklodextrínů v chirální separaci
omeprazolu metodou kapilární
elektroforézy

Application of monosubstituted
cyclodextrins in chiral separation
of omeprazole by capillary
electrophoresis

Diplomová práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Radomíra Čabaly, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 3. 5. 2010

.....
podpis

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, s níž se mi věnoval a pomoc při zpracování výsledků této diplomové práce. Také děkuji doc. RNDr. J. Jindřichovi, CSc. za poskytnutí cyklodextrínů, MUDr. V. Schüllerovi za poskytnutí Helicidu a RNDr. Heleně Puffrové (odbor laboratorní kontroly, SÚKL) za poskytnutí omeprazolu. Dále bych chtěl poděkovat rodině za podporu při studiu a psaní této diplomové práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat kolektivu v laboratoři za pomoc, ochotu a toleranci.

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a rámcového programu 14/63 MŠMT a za přispění Norway Grants (Project CZ0116).

ABSTRACT

Chiral separation of omeprazole was the subject of this work. Five different monosubstituted derivatives of α - and β -cyclodextrins, two of them cationic and three anionics, were used as chiral selectors in various buffers of different pH. The influence of CD and buffer concentrations on chiral separation was studied. Voltage of 25 kV, UV detection in the range from 202 to 303 nm and constant temperature of 20 °C was used for all measurements. Concentration of CDs between 0 and 7 mmol.l⁻¹ was used. Fused silica capillary of 50 μ m ID and 375 μ m OD, 48,5 cm total and 40 cm effective length was used as separation capillary. Dimethylformamide was used in stock solution of omeprazole as solvent, and was simultaneously applied as EOF marker. Successful chiral separation of omeprazole was achieved under the application of 2'-O-carboxymethyl- β -cyclodextrin (2'-CM- β -CD) and mono-6-deoxy-6-N,N,N',N',N'-pentamethylethylenediammonio-cyclomaltoheptaose dichloride (PEMEDA- β -CD) where the resolution of 1,42 (pH = 5,1) and 4,29 (pH = 11,1) was measured, respectively.

ABSTRAKT

Obsahem této práce je studium chirální separace enantiomerů omeprazolu. Pět různých monosubstituovaných derivátů α - a β -cyklodextrínů, z toho dva kationické a tři anionické, bylo použito jako chirální selektory v různých pufrch o různých pH. Byly studovány vlivy koncentrace CD a koncentrace pufru na chirální separaci. Všechna měření byla prováděna při napětí 25 kV s UV detekcí v rozmezí vlnových délek 202 – 303 nm a konstantní teplotě 20 °C. Koncentrace CD byla v rozmezí 0 – 7 mmol.l⁻¹. Jako separační byla využita křemenná kapilára o vnitřním průměru 50 μ m, vnějším průměru 375 μ m, celkové délce 48,5 cm a efektivní délce 40 cm. Koncentrace omeprazolu použitá při separacích byla 0,1 mmol.l⁻¹. Jako organické rozpouštědlo zásobního roztoku omeprazolu byl použit dimethylformamid, který sloužil zároveň jako indikátor EOF. Chirální separace omeprazolu proběhla úspěšně v 2'-O-karboxymethyl- β -Cyklodextrínu (2'-KM- β -CD) a dichloridu mono-6-deoxy-6-N,N,N',N',N'-pentamethylethylenediammoniocyklomaltoheptaosy (PEMEDA- β -CD), kde bylo dosaženo hodnoty rozlišení $R_{2\text{'-KM-}\beta\text{-CD}} = 1,42$ (pH = 5,1) a $R_{\text{PEMEDA-}\beta\text{-CD}} = 4,29$ (pH = 11,1).

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1	OMEPAZOL	11
2.2	KAPILÁRNÍ ZÓNOVÁ ELEKTROFORÉZA	14
2.2.1	Ovlivnění elektroosmotického toku	17
2.2.2	Bezvodá kapilární elektroforéza	19
2.3	CHIRALITA	20
2.3.1	Chirální separace	21
2.3.2	Typ chirálního selektoru	22
2.4	CYKLODEXTRÍNY	22
2.4.1	Inkluzní komplexy cyklodextrínů	25
2.4.2	Modifikované cyklodextríny	26
2.4.3	Chirální separace omeprazolu metodou CE	28
2.4.4	Separace omeprazolu v jiných separačních technikách	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
3.1	CHEMIKÁLIE	31
3.2	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	31
3.3	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ	32
3.3.1	Omeprazol	32
3.3.2	Pufry	32
3.3.3	Cyklodextríny	33
3.4	PODMÍNKY MĚŘENÍ A POSTUP PRÁCE	34
3.5	VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ	35
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
4.1	SEPARACE OMEPAZOLU BEZ PŘÍDAVKU CYKLODEXTRÍNŮ	36
4.2	SEPARACE ENANTIOMERŮ OMEPAZOLU POMOCÍ MONO 6'-O-KM- β -CD	37
4.2.1	Separace v borátovém pufru o pH 9,44	38
4.2.2	Separace ve fosfátovém pufru o pH 5,1	39
4.2.3	Separace ve fosfátovém pufru o pH 3,08	41
4.3	SEPARACE ENANTIOMERŮ OMEPAZOLU POMOCÍ MONO 3-O'-KM- β -CD	42
4.3.1	Separace v borátovém pufru o pH 9,44	42
4.3.2	Separace ve fosfátovém pufru o pH 5,1	44
4.3.3	Separace ve fosfátovém pufru o pH 3,08	45
4.4	SEPARACE ENANTIOMERŮ OMEPAZOLU POMOCÍ MONO 2-O'-KM- β -CD	46
4.4.1	Separace v borátovém pufru o pH 9,44	46
4.4.2	Separace ve fosfátovém pufru o pH 5,10	48
4.4.3	Separace ve fosfátovém pufru o pH 3,08	50
4.5	SEPARACE ENANTIOMERŮ OMEPAZOLU POMOCÍ PEMEDA- α -CD	51
4.5.1	Separace v borátovém pufru o pH 9,44	52
4.5.2	Separace ve fosfátovém pufru o pH 11,1	54
4.6	SEPARACE ENANTIOMERŮ OMEPAZOLU POMOCÍ PEMEDA- β -CD.	56
4.6.1	Separace v borátovém pufru o pH 9,44	56
4.6.2	Separace omeprazolu v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 10 mmol.l ⁻¹ ..	58
4.6.3	Separace ve fosfátovém pufru o pH 11,1	60

4.6.4	Separace Helicidu v borátovém pufru o pH 9,44	61
5	ZÁVĚR	64
6	LITERATURA	66

Seznam použitých zkratk

2'-KM- β -CD	mono 2'-O-karboxymethyl- β -cyklodextrin
3'-KM- β -CD.....	mono 3'-O-karboxymethyl- β -cyklodextrin
6'-KM- β -CD	mono 6'-O-karboxymethyl- β -cyklodextrin
BSA	bovinní sérový albumin
CD	cyklodextrín
CE	kapilární elektroforéza
CE - MS	kapilární elektroforéza s hmotnostní detekcí
CEC	kapilární elektrochromatografie
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DMF	dimethylformamid
EOF	elektroosmotický tok
ESI - MS	hmotnostní spektrometr s elektrosprejovou ionizací
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
l_c	délka celé kapiláry
l_d	délka kapiláry k detektoru
LD50	smrtící dávka pro 50% sledovaných objektů
$m_{ef,i}$	elektroforetická mobilita pro látku i
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
n	látkové množství
N	počet teoretických pater
NACE	bezvodá kapilární elektroforéza
NMR	nukleární magnetická resonance
PEMEDA- β -CD	dichlorid mono-6-deoxy-6-N,N,N',N',N'- pentamethylethylendiammoniocyklomaltoheptaosy
PEMEDA- α -CD.....	dichlorid mono-6-deoxy-6-N,N,N',N',N'- pentamethylethylendiammoniocyklomaltohexaosy
$R_{1,2}$	rozlišení mezi peaky 1 a 2

RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SFC	superkritická fluidní chromatografie
TLC	tenkovrstvá kapalinová chromatografie
$t_{mig,i}$	migrační čas látky i
t_{eof}	migrační čas elektroosmotického toku
t_t	teplota tání
t_v	teplota varu
U	elektrické napětí
UV	ultrafialové záření
Vis	viditelné spektrum světla
w	šířka píku při základně
$w_{0,5}$	šířka píku v polovině výšky
α	separační faktor
λ	vlnová délka
ΔH°	změna standardní entalpie látky
ΔS°	změna standardní entropie látky

1 Úvod

Separace chirálních látek v nevodném, vodném nebo částečně nevodném prostředí má široké využití. Často se používá v lékařství, kde to má své opodstatnění, protože mnohé enantiomery jsou účinnější samotné než směs obou enantiomerů. Lepší pochopení odlišného farmakokinetického chování a farmakologického působení enantiomerů léků iniciovalo výzkumy separací optických izomerů léků¹.

Z často publikovaných separovaných farmaceutických skupin analytů to jsou například anticholinergní látky (Anisodamin, Glykopyrronium, Atropin) nebo analgetika (ibuprofen, fenoprofen). Z jednotlivých chirálních léků byla publikována separace např. Arutimolu, sloužící k léčbě zeleného zákalu, omeprazolu k léčbě gastritid a dalších.

Mezi další separované látky, které nepatří mezi léčiva, se řadí třeba fytosteroly nebo organofosfátové pesticidy. Další užití má enantioseparace v kosmetice, potravinářském průmyslu a v mnoha dalších chemických odvětvích.

Kapilární elektroforéza (CE) je populární technikou pro chirální separaci biologicky aktivních látek². Velký vliv na separaci, kromě volby vhodného rozpouštědla nebo pufru, má volba chirálního činidla. V CE se často používají jako chirální činidla cyklodextríny (CD). Mezi výhody cyklodextrínů patří dobrá rozpustnost ve vodě, stabilita, jsou levné, neabsorbují v UV oblasti a díky možnosti derivatizace mají různorodé vlastnosti². Z dalších technik, kde se využívají CD pro chirální separace, je možno jmenovat vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (HPLC), plynovou chromatografii (GC), superkritickou fluidní chromatografii (SFC), tenkovrstvou kapalinovou chromatografii (TLC) a kapilární elektrochromatografii (CEC).

Velmi dobrými chirálními činidly jsou sulfatované β -cyklodextríny, které mají dobrou separační schopnost už při nízkých koncentracích³.

Diplomová práce je zaměřena na chirální separaci racemického roztoku omeprazolu pomocí kapilární zónové elektroforézy ve vodném prostředí. Omeprazol je v lékařství často využívaný a je mu věnováno několik vědeckých prací, které se zabývají chirální separací. Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda-li mono 2'-, mono 3'- a mono 6'-O-karboxymethyl- β -cyklodextríny, dichlorid mono-6-deoxy-6-N,N,N',N',N'-pentamethylethylendiammoniocyklomaltoheptaosy a dichlorid mono-6-deoxy-6-N,N,N',N',N'-pentamethylethylendiammoniocyklomaltohexaosy jsou schopny rozdělit R- a S-omeprazol, porovnat jejich účinnost, vlastnosti, chování a zjistit jejich možné využití v chirální separaci metodou CE. Omeprazol byl vybrán na základě publikované literatury, kde jsou

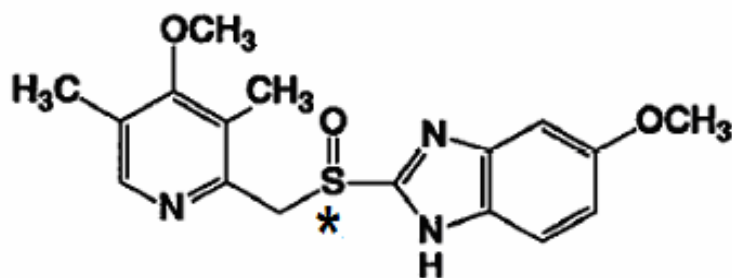
popsané jeho vlastnosti, separace pomocí některých derivátů β -CD a také pro jeho relativně snadnou dostupnost v ČR.

2 Teoretická část

2.1 Omeprazol

Klinické a fyziologické vlastnosti

Omeprazol je účinná látka mnoha léků, působící jako inhibitor protonové pumpy žaludečních přístěnných buněk, široce užívaná k léčbě žaludečních vředů a gastritid⁴. Omeprazol a jeho analogy jsou efektivními inhibitory sekrece žaludeční kyseliny, za kterou je zodpovědný enzym $H^+ K^+ ATPasa$. Omeprazol je v organismu aktivován protonací a lze ho využít u lidí i zvířat (pes, kůň, potkan, kočka a další)⁵. Jeho systematický název je {5-methoxy-2-[(4-methoxy-3,5-dimethylpyridin-2-yl) methylsulfinyl]-1*H*-benzo[*d*]imidazol}. Omeprazol obsahují léky různých firem jako například Apo-Ome, Losec, Loseprazol nebo Helicid, který vyrábí firma Zentiva.



Obrázek 1: Struktura omeprazolu⁶

Omeprazol je chirální látka, jejíž chirální centrum se vyskytuje na síře. Uvádí se, že 25 % léků podávaných lidem, je ve formě racemátu, přičemž enantiomery mají jiné účinnosti³. Díky tomu bylo v Americe a Evropě vydáno doporučení produkovat chirální léky ve formě čistých enantiomerů, což by mělo zaručit nižší produkci pro organismy neúčinných enantiomerů a snížení ekologického zatížení⁷. *S*-enantiomer omeprazolu, nazývaný esomeprazol, znatelně převyšuje racemický omeprazol v klinickém efektu⁸.

Nověji se ukázalo, že *S*-enantiomer omeprazolu (esomeprazol) je podstatně účinnější, než *R*-enantiomer, který má u člověka pouze asi 10 % účinnosti esomeprazolu. Esomeprazol je zároveň příkladem problému s výběrem zvířecího modelu v experimentální

farmakologii: *R*-enantiomer byl účinnější než *S*-enantiomer a racemát u potkana, zatímco u psa není žádný rozdíl v aktivitě obou enantiomerů^{9,10}. V ČR je již esomeprazol registrován jako Escitalopram (Cipraxel firmy Lundbeck) a Esomeprazol (Nexium, AstraZeneca)⁹.

Lékařská indikace, antioxidační vlastnosti, metabolismus

U pacientů je indikován k léčbě duodenálních vředů, žaludečních vředů a erozí v souvislosti s podáváním nesteroidních antirevmatik-antiflogistik, refluxní ezofagitidy, k eradikaci *Helicobacter pylori* u vředové choroby gastroduodena. Dále slouží k léčbě symptomatické refluxní choroby jícnu, k léčbě funkční dyspepsie vyvolané převážně poruchou regulace kyselé žaludeční sekrece. Užívá se rovněž k léčbě Zollinger-Ellisonova syndromu a k profylaxi aspirace žaludečního obsahu u rizikových pacientů v průběhu celkové anestezie¹¹.

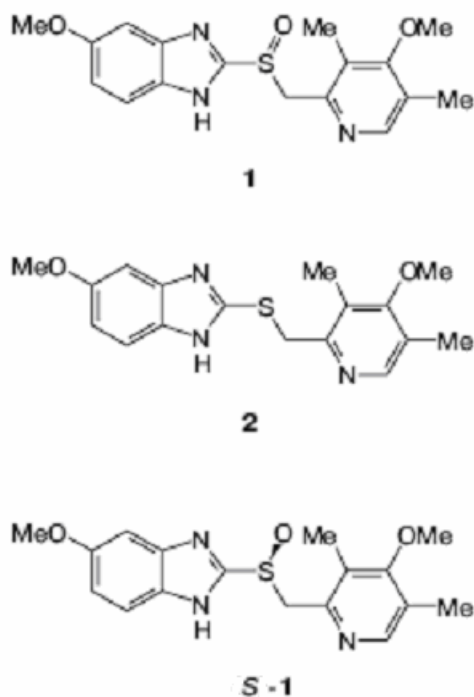
Kromě těchto léčivých účinků má navíc antioxidační účinky. Zabraňuje vzniku látek, souvisejících s oxidativním stresem, který vyvolává nemoci jako jsou právě žaludeční vředy nebo gastritidy. Mezi látky vyvolávající oxidativní stres se řadí fyziologická kyselina chlorná (HOCl), která ničí antioxidanty, jako je např. β – karoten. Další z možných příčin oxidativního stresu je produkce železitých a měďnatých kationtů, při jejichž redukci se může oxidovat deoxyriboza, která je součástí DNA. Omeprazol v aktivní (protonované) formě při pH 3,5 inhibuje vznik HOCl ze 100% už jako 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ a při pH 5,3 jako 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (in vitro)¹². Omeprazol je metabolizován převážně v játrech enzymovým systémem cytochromu P450 2C19 (CYP2C19)¹¹.

Chemické a fyzikální vlastnosti

Relativní molekulová hmotnost (M_r) omeprazolu je 345,4, jeho pK_a má hodnotu mezi 4 a 8,8^{13,14,15} a bod tání omeprazolu je 156 °C¹⁶. Pro potkana je akutní orální toxicita LD50 rovna 2210 mg/kg¹⁶. Omeprazol je v roztoku při nízkém pH velmi nestabilní. Z toho důvodu se acidita jeho roztoků upravuje až při měření. Lze ho ovšem uchovávat ve vhodných zásobních roztocích. Ve vodě omeprazol degraduje v kyselém prostředí během několika hodin, zatímco v zásaditém mnohem pomaleji^{17,18}. Uvádí se, že při pH = 11 je jeho poločas rozpadu 300 dní¹⁷. Z nevodných rozpouštědel je velmi vhodný N-methylformamid a dimethylformamid. Méně vhodný na uchování omeprazolu je ethanol a methanol. Acetonitril se nedoporučuje, protože urychluje jeho rozklad¹⁷.

Syntéza opticky aktivního omeprazolu

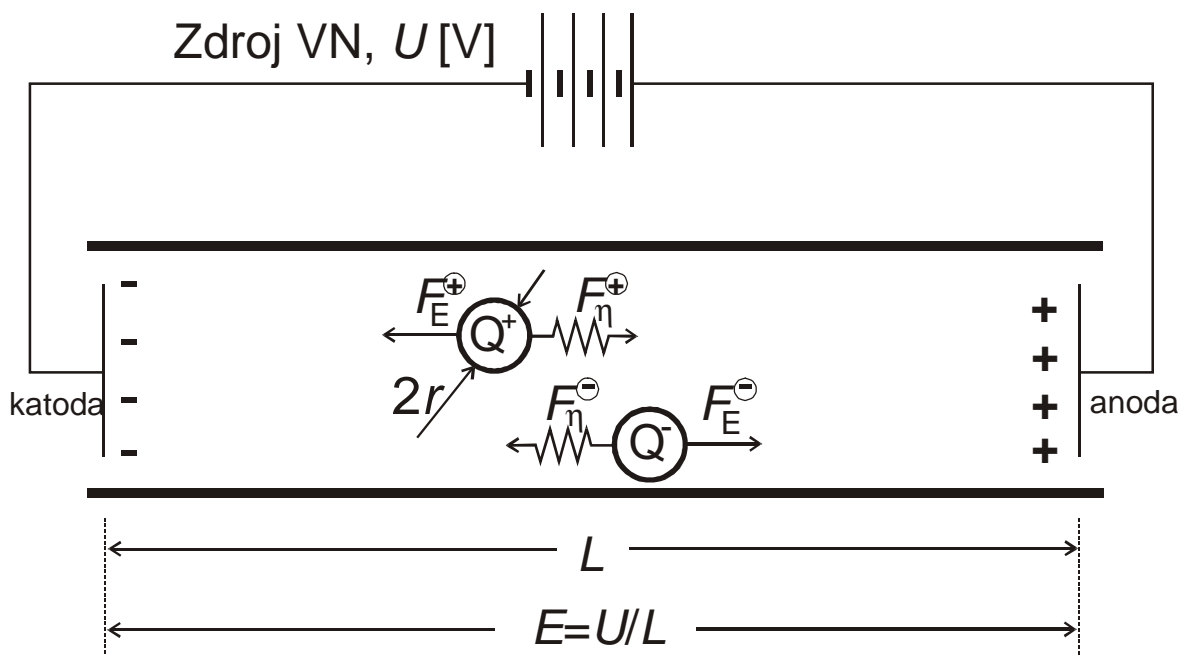
Důvodem k syntéze opticky čistého omeprazolu je odlišná biologická účinnost esomeprazolu v porovnání s racemátem. Jednotlivé enantiomery lze získat buď separací směsi *R*- a *S*-omeprazolu nebo chirální syntézou, například pomocí katalýzy s vanadylovým komplexem a chirální Schiffovou bází. Zjednodušeně řečeno jde o asymetrickou oxidaci prochirálního sulfidu (Obrázek 2 – **2**) se stechiometrickým množstvím (3*S*,2*R*)-(-)-*N*-fenylsulfonyl-(3,3-dichlorkafryl) oxaziridinu (Davisovo činidlo¹⁹), což dovoluje získat opticky aktivní omeprazol (Obrázek 2 – **1**) v enantiometrickém nadbytku 40%. Další zvyšování nadbytku sulfoxidu je založeno na různé rozpustnosti racemátu v porovnání s esomeprazolem (Obrázek 2 – *S* – **1**)⁸.



Obrázek 2: Struktury opticky aktivního omeprazolu (**1**), prochirálního sulfidu (**2**) a esomeprazolu (*S* – **1**)⁸

2.2 Kapilární zónová elektroforéza

Kapilární elektroforéza patří mezi elektromigrační metody, což jsou metody, v nichž dochází k separaci nabitých částic (iontů) ve vzorku na základě jejich různé rychlosti pohybu v elektrickém poli. Princip těchto metod je shrnut na obrázku 3, z něhož vyplývá, že na nabité částice v elektrickém poli působí několik faktorů, které ovlivňují jeho výslednou rychlost²⁰.



Obrázek 3: Schéma znázorňující pohyb nabitých částic v elektrickém poli²⁰

$$F_E = f(|Q|, E) \quad (1)$$

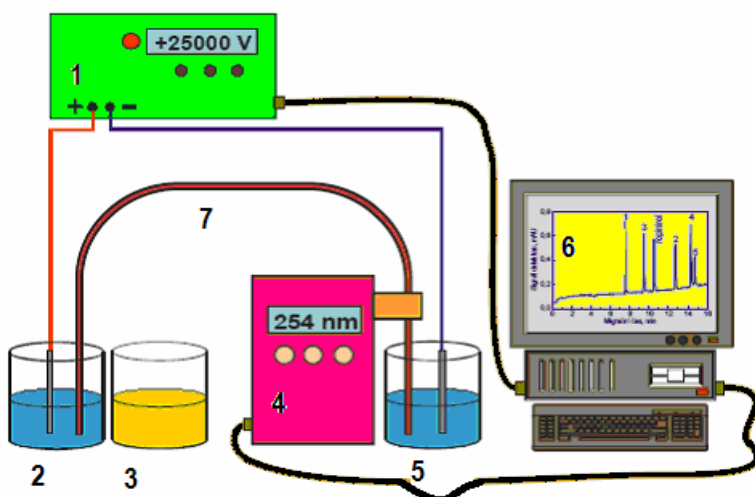
Na iont působí síla F_E , která ho urychluje vlivem elektrického pole a je funkcí absolutní hodnoty elektrického náboje iontu Q a intenzity elektrického pole E (rovnice 1).

$$F_\eta = f(r, \eta) \quad (2)$$

Proti F_E působí viskozitní síla F_η , která zpomaluje pohyb částic vlivem mechanického tření a je funkcí poloměru iontu r a vizkozity prostředí η (rovnice 2).

$$v = f(1/\eta, E, |Q|, 1/r) = \mu E \quad (3)$$

Za rovnováhy těchto dvou sil je rychlost iontu v rovna součinu elektroforetické pohyblivosti μ a intenzity elektrického pole E . Rychlost iontu v je za těchto podmínek funkcí převrácené hodnoty vizkozity, převrácené hodnoty poloměru iontu, intenzity elektrického pole a absolutní hodnoty náboje (rovnice 3). U je elektrické napětí a L je délka kapiláry.

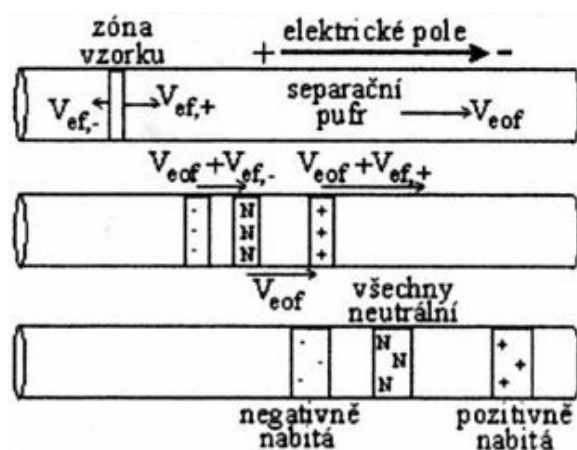


Obrázek 4: Schéma CZE: 1- zdroj vysokého napětí, 2- vstupní vialka s elektrolytem, 3- dávkovací vialka s analytem, 4- detektor spojený s počítačem, 5- výstupní vialka, 6- elektroferogram vyhodnocený pomocí počítačového softwaru, 7- kapilára²¹

Z obrázku 4 je vidět uspořádání CZE přístroje. Do vstupní vialky je zavedena anoda (+) a do vialky, kam odtéká detegovaný roztok je zavedena katoda. Spojení elektrod a vznik elektrického pole zajišťuje kapilára, která je naplněna vodivým roztokem, což je zpravidla separační roztok (pufr, rozpouštědlo)²⁰. Zdroj vysokého napětí slouží k regulaci vkládaného napětí a umožňuje ovlivňovat rychlost elektroosmotického toku. Pro analýzu se volí nejmenší možné napětí a proud, aby se zamezilo Jouleovu ohřevu a disperzi zón²². Malý průměr kapiláry má tu výhodu, že umožňuje efektivně odvádět teplo a tím snižuje rozmývání zón^{22,23}.

Dávkování vzorku provádíme hydrodynamicky, elektrokineticky nebo může být vzorek dávkován řízeným tlakem, což se nejčastěji užívá u komerčně dodaných přístrojů. Hydrodynamické dávkování je oproti ostatním typům dávkování mnohem méně přesné, ale je nejjednodušší²³.

Nadávkovaná směsná zóna vzorku se v separačním prostoru pohybuje nejen vlivem elektrického pole, ale i vlivem EOF. V průběhu migrace dochází k oddělování komponent vzorku s odlišnou elektroforetickou pohyblivostí, které se soustřeďují do samostatných zón²³.

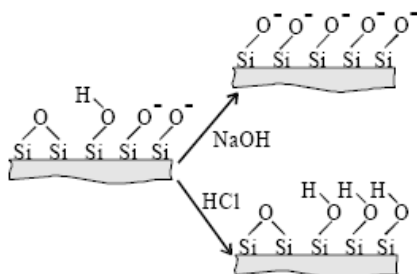
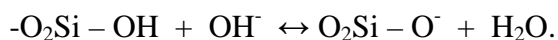


Obrázek 5: Princip CE separace nabitých komponent analytu²⁴

Detektor registruje jednotlivé zóny na konci separačního prostoru a výsledek se zaznamenává ve formě elektroferogramu²³. Velmi využívaným detektorem pro CZE je UV/Vis detektor (optické detektory), další možné detektory jsou například elektrochemické nebo MS²⁰. Vlivem záporně nabitého povrchu kapiláry a vlivem vkládaného elektrického napětí vstupují kladně nabitě částice do cely detektoru jako první, poté vstupují neutrální částice a na závěr záporně nabitě částice. Měrnou celou detektoru je nejčastěji samotná kapilára, zbavená polyimidového obalu, která je v tomto místě velmi křehká. Pro výpočet, zpracování výsledků a k rozlišení nabitých částic od neutrálních musíme znát migrační čas nenabitých látek, což je migrační čas elektroosmotického toku. V případě, že analyzovaná směs neobsahuje s jistotou neutrální analyt, přidáváme do vzorku známé množství neutrální látky jako marker EOF.

Nejčastěji se jako separační používá křemenná kapilára o vnitřním průměru 50-100 μm , potažená na povrchu polyimidem, který propůjčí kapiláře pružnost. Kapilára by se před použitím měla aktivovat, což se dělá roztokem hydroxidu. Velmi často využívaným

louhem je NaOH o koncentraci $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ nebo 1 mol.l^{-1} , kterým kapiláru promýváme. Promývání tímto roztokem způsobí, že vzroste plošná hustota silanolových skupin vázaných na stěny kapiláry²². Princip tohoto procesu lze vystihnout rovnicí:

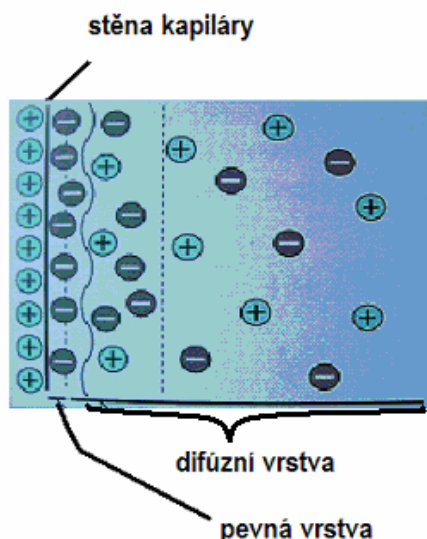


Obrázek 6: Chování vnitřních stěn kapiláry v závislosti na pH²⁴

Důležitým faktorem ovlivňující separaci v CZE je pufr. Musíme dobře zvážit jeho volbu vzhledem k stanovované látce, k její rozpustnosti a stabilitě v daném pH, atd. . Pufry obsahují slabou kyselinu (slabou zásadu) a její sůl, z čehož vyplývá, že existuje nepřeberné množství pufů pro různé škály pH. Pufry, jakožto základní elektrolyt ovlivňují i velikost elektrického proudu v kapiláře. Koncentrace pufru může ovlivnit rozlišení, mobilitu a také jeho pufracní kapacitu. Tím ovlivní i účinnost separace jednotlivých látek, které chceme analyzovat^{24,25}. Další možností je použít CZE v bezvodém prostředí (NACE), kde ovšem pH není definováno a proto se určuje pH*. Další možností je směs vodné a nevodné fáze. Je to propojení obou předchozích možností v různém, volitelném poměru, kde se kloubí výhody i nevýhody obou těchto prostředí. Zjištění optima pro účinnost, rychlost, kvalitu, selektivitu a reprodukovatelnost separace je obtížné, protože tyto požadavky na separaci mají často protichůdné nároky.

2.2.1 Ovlivnění elektroosmotického toku

Podíl na fungování CE má elektroosmotický nebo elektroendosmotický tok (EOF). EOF je celkový tok kapaliny v kapiláře a je důsledkem povrchového náboje na vnitřní stěně kapiláry. Vzniká jako efekt aplikace elektrického pole na elektrickou dvojvrstvu na stěně kapiláry (obrázek 7). Elektroosmotický tok ovlivňuje čas , který stráví rozpuštěné látky v kapiláře, díky jeho významnému vlivu na zdánlivou mobilitu rozpuštěných látek. Změnou délky kapiláry lze ovlivnit dobu separace, nikoliv však selektivitu²⁶.



Obrázek 7: Elektrická dvojvrstva na kapilární stěně²⁶

Metody pro kontrolu elektroosmotického toku

Existuje několik proměnných faktorů, které ovlivňují elektroosmotický tok. Patří mezi ně intenzita elektrického pole, pH pufru, iontová síla a koncentrace pufru a organický modifikátor elektrolytu nebo jiného aditiva (teplota), dále povrchová modifikace vnitřního povrchu kapiláry²⁶.

Vysoké napětí generuje větší proud a tím i více tepla v kapiláře, mění elektroosmotický tok, ale také může způsobit zkrat nebo jiskření. Podíl na tom má vysoká iontová síla, která generuje vlivem napětí velký elektrický proud a způsobuje Jouleovo teplo. Při nižší iontové síle roste rychlost EOF a klesá pufrační kapacita. Někdy se může zóna nahromaděného vzorku lišit iontovou silou, což způsobí deformaci tvaru píku vlivem odlišné vodivosti zóny vzorku a elektrolytu²⁶.

Teplotu kapiláry je nutné kontrolovat, jelikož při změně teploty dochází ke změně viskozity a tím dochází i ke změně EOF. Při zvýšení teploty o 1 °C dojde ke snížení viskozity elektrolytu o 2 - 3 %. Viskozitu elektrolytu lze ovlivnit také organickým modifikátorem, který mění zeta potenciál a tím způsobuje komplexní změny EOF. Vliv modifikátoru na elektrolyt lze nejlépe zjistit experimentálně, kde se to projeví například změnou selektivity²⁶.

Rychlost EOF můžeme také ovlivnit změnou pH nebo přidáním některých aditiv do elektrolytu. V kyselém pH klesá rychlost EOF, naopak v zásaditém rychlost roste. Aditiva, mezi která patří např. povrchové aktivní látky, mohou změnit rychlost a směr EOF. Dochází k dynamické adsorpci aniontů nebo kationtů na kapilární stěnu pomocí

hydrofobních či iontových interakcí. Přepólováním kapiláry lze elektrosmotický tok obrátit, přičemž anionty mohou EOF zrychlit a kationty ho naopak mohou zpomalit²⁶.

Pomocí neutrálního hydrofilního polymeru dochází ke zpomalení EOF, nicméně díky polymeru lze jeho rychlost lépe kontrolovat, což se provádí stíněním povrchového náboje kapiláry a zvýšením viskozity. K adsorpci polymeru na stěnu kapiláry dochází pomocí hydrofilních interakcí, kde zároveň dojde k potlačení interakce mezi vnitřní stěnou kapiláry a analytem²⁶.

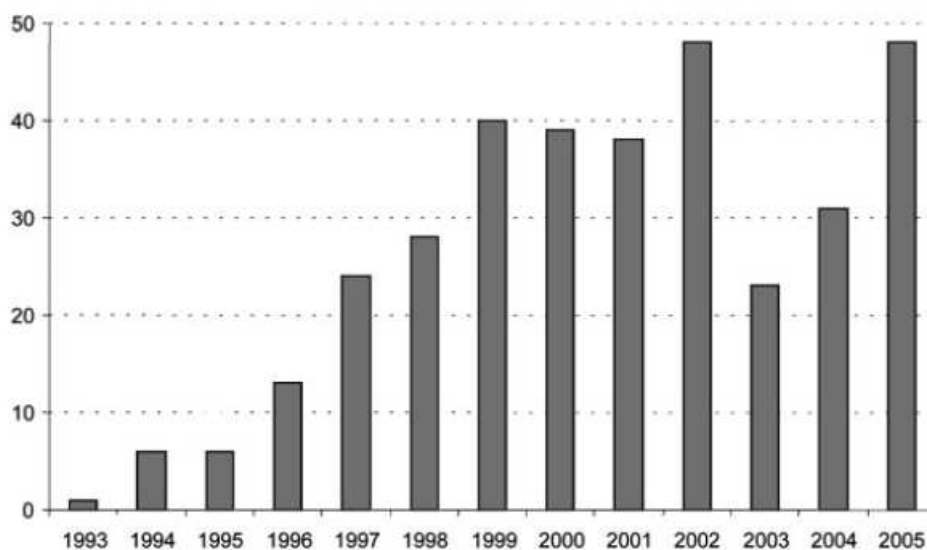
EOF závisí na náboji a polaritě vnitřního povrchu. Změnou vlastností povrchu kapiláry pomocí kovalentně vázané povrchové vrstvy (povrchový film) lze dosáhnout jiné interakce analytu s povrchem kapiláry. Existuje mnoho možných modifikací vnitřního povrchu kapiláry, jako například změna hydrofility, náboje, atd. . Udržení stability modifikovaného povrchu může být problematické²⁶.

Výhody a nevýhody kapilární zónové elektroforézy

Tato metoda má mnoho výhod a nevýhod. Výčet, který je uveden není určitě úplný, ale postačí pro lepší pochopení techniky. Mezi výhody určitě patří: velká separační účinnost, neustálý vývoj metody, krátká doba analýzy, malá spotřeba vzorku, snadné odstranění všech látek z předchozí analýzy, snadné a rychlé určení pK_a analytů a kompatibilita s MS detekcí. Naopak mezi nevýhody použití této metody patří: menší selektivita, malá robustnost, nestabilita elektrosmotického toku, horší opakovatelnost a reprodukovatelnost a obtížnější validace analýz užívající CZE²¹.

2.2.2 Bezvodá kapilární elektroforéza

Zkratka NACE vychází z anglického Non Aqueous Capillary Electrophoresis. Použití bezvodé fáze uskutečnil poprvé M. Hayek a svou práci publikoval v *Journal of Physical and Colloid Chemistry* v roce 1951²⁷. Pojednával v ní o mobilitě částic sazí v kerosínu. Metoda se rychle rozvíjí a rostoucí oblibu této metody dokládá i obrázek 8.



Obrázek 8: Počet publikací o NACE od roku 1993 do roku 2005 v Chemical abstract a Medline²⁸

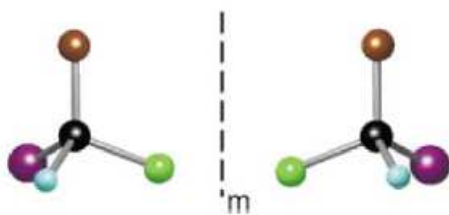
2.3 Chiralita

Sloučenina je chirální, pokud existuje ve dvou formách, které jsou z hlediska spojení atomů v molekule stejné, ale prostorovým uspořádáním jsou obě formy neidentické a jsou vzájemně svými zrcadlovými obrazy. Pojem chiralita poprvé definoval Lord Kelvin v roce 1904 slovy: „Nazývám nějaký geometrický obraz nebo skupinu bodů disymetrickými (chiral) a říkám, že mají disymetrii (chirality) pokud jejich obraz v rovném zrcadle, ideálně realizovaný, nemůže přinést vzájemnou schodu....“ (Obrázek 9)²⁹.

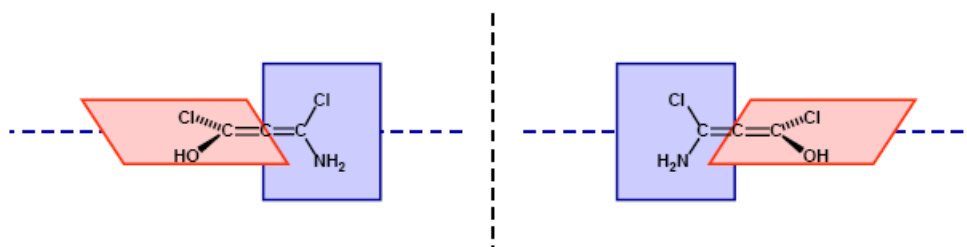


Obrázek 9: Zrcadlový - disymetrický obraz ruky²⁹

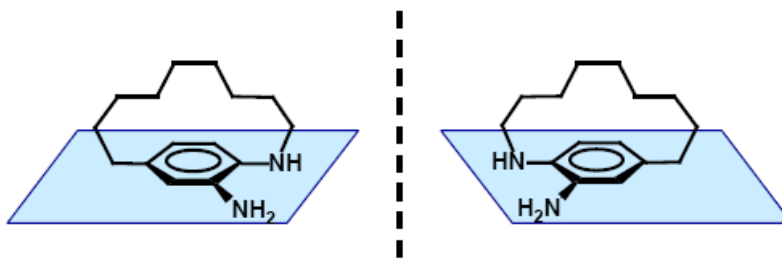
Chiralitu dělíme podle prvků chirality, který se v chirální molekule uplatňuje, na chiralitu centrální, axiální, planární a helikální (Obrázky 10, 11, 12 a 13)²⁹.



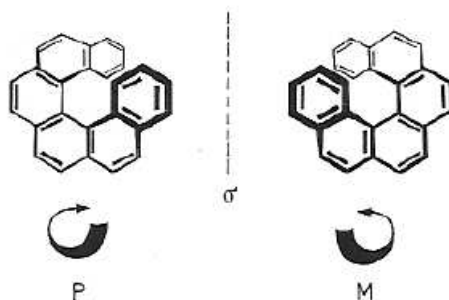
Obrázek 10: Příklad centrální chiralidy²⁹



Obrázek 11: Příklad axiální chiralidy²⁹



Obrázek 12: Příklad planární chiralidy²⁹



Obrázek 13: Příklad helikální chiralidy²⁹

2.3.1 Chirální separace

Při interakci léčiv s cílovými strukturami (receptory) v organismu se uplatňují účinněji ty látky, jejichž struktura odpovídá aktivnímu místu farmakologického receptoru. Vyskytuje-li se léčivo ve dvou (nebo více) prostorových izomerech (enantiomerech), pak se lépe váže na receptor ten izomer, jehož struktura koresponduje dokonaleji se strukturou aktivního místa. Druhý stereoizomer může být farmakologicky neúčinný, méně účinný nebo může vykazovat zcela jiný (i nežádoucí) účinek. Tyto skutečnosti jsou

dokumentovány na příkladech dexketoprofenu, citalopramu, omeprazolu a dextrometorfanu⁹.

Chiralita byla a stále je důležitým faktorem při vývoji léků ve farmaceutickém průmyslu. Navíc vzniká neustále více chirálních agrochemikálií, voňavek, potravinářských příchutí, léčidel a funkčních chemikálií. Z nedávného výzkumu plyne, že nárůst výroby chirálních chemikálií (hnojiv, léků, atd.) roste v průměru o 11% ročně³⁰. Chirální separace je velmi důležitá, protože díky ní můžeme snadněji kontrolovat kvalitu vzniklých produktů, meziproduktů nebo reaktantů při výrobě a po ní, během skladování a před aplikací. Z tohoto důvodu jsou požadovány analytické techniky, které rychle rozpoznají změnu chiralit způsobené v chemickém průmyslu nebo v přírodě. Mezi nejúčinnější separační techniky patří HPLC, GC, CE a SFC, dále je možné využít například NMR. Další techniky se pro chirální separaci tolik nehodí. Může to být způsobeno neslučitelností chirální separace s daným přístrojem, kvůli mnoha nevýhodám, problémům s tím spojených nebo kvůli horší účinnosti separace³⁰.

2.3.2 Typ chirálního selektoru

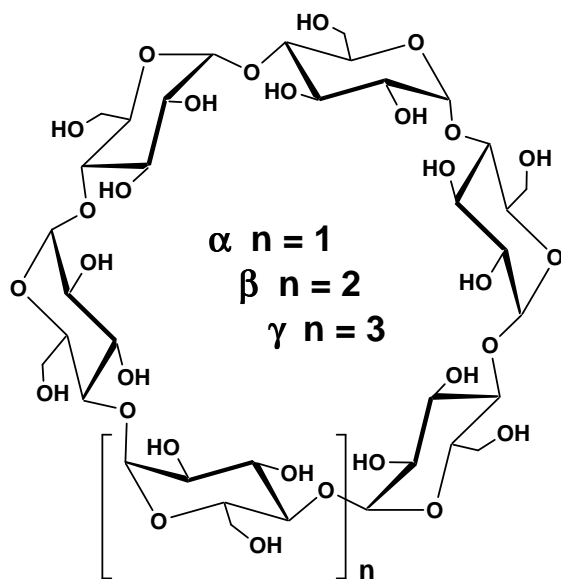
Výběr chirálního selektoru provádíme ve vodné fázi, samozřejmě s ohledem na rozpustnost látky v námi použitém rozpouštědle. Významnými selektory v CZE jsou bezpochyby cyklodextríny. Základním nativním cyklodextrínem je β -cyklodextrín, který je ve vodě jen málo rozpustný, což je jeden z důvodů, proč se cyklodextríny různě modifikují^{31,32}. Zajímavé je, že β -CD je více než 10x rozpustnější ve formamidu a důsledkem toho lze dosáhnout mnohem lepšího separačního rozlišení analytů³¹. Mezi další selektory patří chirální crown ethery, chinin³¹, ale třeba i hovězí sérový albumin³³.

Mezi další faktory ovlivňující chirální separace v CE patří teplota, iontová síla, pH, elektroosmotický tok a další³¹.

2.4 Cyklodextríny

Cyklodextríny jsou makrocyclické oligosacharidy vznikající enzymatickou degradací škrobu. Mají nepolární kavitu, díky které mohou tvořit inkluzní komplexy s

mnoha látkami. D-glukopyranosové jednotky jsou spojeny α -1,4-glykosidickou vazbou, přičemž počet jednotek závisí na druhu cyklodextrínu (tabulka 1)³⁴.



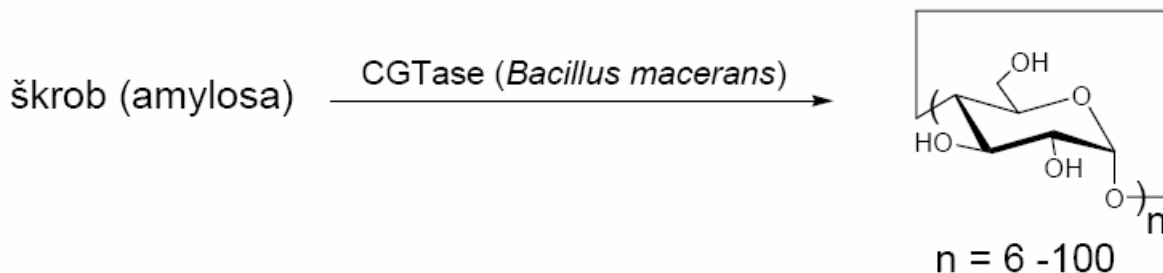
Obrázek 14: Struktura molekuly cyklodextrínu³⁵

Mimo základní cyklodextríny (α , β , γ) mohou být synteticky připraveny i cyklodextríny, které mají 5 D-glukopyranosových jednotek, tzv. pre α -CD³⁴ nebo cyklodextríny mající 9 a více jednotek³⁶.

Tabulka 1. Základní charakteristiky cyklodextrínů^{37,38}

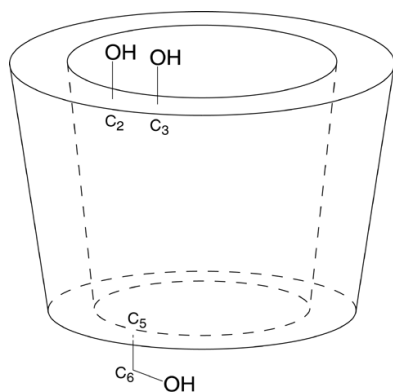
Charakteristika	α -CD	β -CD	γ -CD
Počet glukozových jednotek	6	7	8
Objem dutiny[10 ⁶ pm ³]	174	262	427
Relativní molekulová hmotnost	972,86	1135,01	1297,15
Optická otáčivost [°]	153	162	176,1
Vnitřní průměr dutiny[nm]	0,57	0,78	0,95
Vnější průměr dutiny[nm]	1,37	1,53	1,69
Výška torusu[nm]	0,78	0,78	0,78
Rozpustnost ve vodě [mol.l ⁻¹]	0,114	0,016	0,179
pK _a	12,33	12,2	12,08

Cyklodextríny jsou rozpustné ve vodě, dimethylformamidu, dimethylsulfoxidu a pyridinu. Jsou nestabilní, neabsorbují ve VIS spektru, jsou biodegradabilní a mohou být modifikovány za vzniku derivátů CD^{38,39}. Cyklodextríny jsou průmyslově vyráběny štěpením škrobu pomocí enzymu cyklodextrín-transglykosylázy, který produkují mnohé mikroorganismy (*Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*, atd.)³⁸.



Obrázek 15: Schéma syntézy cyklodextrínů enzymatickou degradací⁴⁰

Tvar α , β a γ -CD je v podstatě stejný, ovšem liší se velikostí (průměrem kavity). Tvarem připomíná komolý jehlan nebo torus⁴⁰, kde se primární hydroxylové skupiny na uhlících C-6 nacházejí na užší straně a zbývající, sekundární hydroxylové skupiny na uhlících C-2 a C-3, jsou situovány na straně opačné. Všechny skupiny jsou nasměrovány vždy směrem od molekuly. Hydroxylová skupina v poloze C-2 jedné glukosové jednotky může tvořit vodíkovou vazbu s hydroxylem v poloze C-3 vedlejší jednotky, čímž je dán vznik kompletního pásu intramolekulárních vodíkových můstků. Tento pás zajišťuje molekule rigidní charakter. Nejrigidnější strukturu ze všech známých cyklodextrínů má β -cyclodextrín, ale zároveň tato jeho stavba způsobuje jeho nižší rozpustnost ve vodě ($10 \times$ oproti α a γ)³⁵.



Obrázek 16: Schématický náčrt molekuly CD³⁵

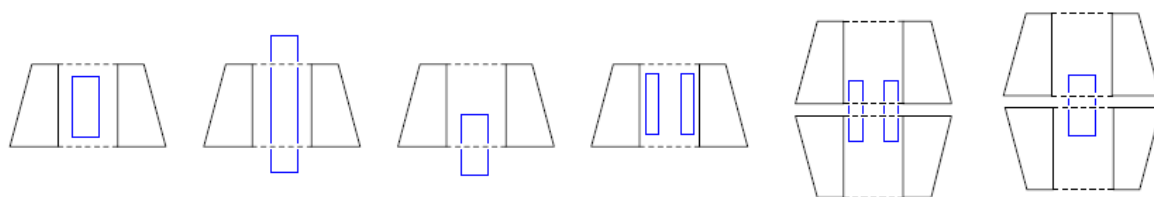
Struktura molekuly CD udává jejich unikátní fyzikální a chemické vlastnosti. Mírně hydrofóbní kavita je okupována ve vodném roztoku molekulami vody, které mohou být pohotově nahrazeny méně polárními molekulami za vzniku komplexu³⁸.

2.4.1 Inkluzní komplexy cyklodextrínů

Tvorba inkluzních komplexů je založena na interakcích nekovalentní povahy (elektrostatické interakce, van der Waalsovy síly, $\pi - \pi$ interakce) a na stérických efektech. Inkluzní komplexy jsou nejčastěji tvořeny v poměru CD:host 1:1, 1:2, 2:1, jsou stabilní pouze ve vodných roztocích a jejich stabilita klesá s rostoucí teplotou³⁸.

Stechiometrie komplexů závisí na velikosti kavity a charakteru hosta, přičemž komplexy různých stechiometrií mohou v roztoku koexistovat v rovnováze. Fyzikálně-chemickými metodami (NMR, kalorimetrie, UV) byly stanoveny asociační konstanty a termodynamické parametry několika tisíc inkluzních komplexů převážně nativních cyklodextrínů. Ve většině případů je ΔH° záporná a ΔS° rovněž záporná – hnací silou tvorby komplexu je tedy enthalpický zisk, který se skládá z několika příspěvků. V literatuře je uváděn především "neklasický" hydrofobní efekt spočívající v uvolnění nepolární molekuly hosta z polárního vodného prostředí a jeho transfer do semipolární kavity cyklodextrínu. Host je v makrocyklu stabilizován van der Waalsovými, disperzními, případně vodíkovými vazbami. Předpokládá se, že významným příspěvkem je uvolnění izolovaných molekul vody s vysokou energií z nepolárního prostředí kavity a jejich integrace do okolní vody. Orientaci hosta v kavitě lze v roztoku většinou zjistit detekcí dipolárních interakcí vhodnou metodou NMR. Studie inkluzních komplexů β -cyklodextrínu se steroidními deriváty prokázaly jejich vysoce dynamický charakter – molekuly hosta v dutině cyklodextrínu rotují kolem osy C_7 a kmitají rovnoběžně s touto osou⁴⁰.

Lze říci, že cyklodextrín může tvořit inkluzní komplex s jakoukoliv molekulou, avšak je nutné mít na paměti, že vznik je omezen velikostí dutiny kavity cyklodextrínů, protože není možné utvořit komplex s molekulou větší, než je samotná dutina. Uvádí se, že α -CD komplexuje alifatické uhlovodíky, β -CD aromatické sloučeniny a γ -CD větší molekuly jako např. fulleren nebo pyren³⁵.

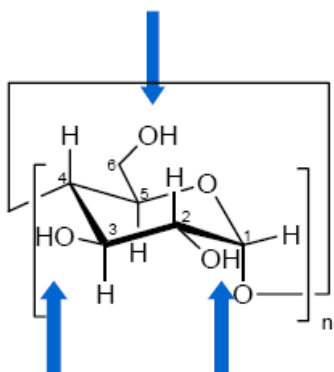


Obrázek 17: Schematické znázornění inkluzních komplexů několika možných stechiometrií⁴⁰

2.4.2 Modifikované cyklodextríny

Nativní cyklodextríny (nemodifikované) již našly široké využití v průmyslu především díky ceně, avšak chemickou modifikací lze docílit a měnit požadované chemicko-fyzikální vlastnosti. Obrovské úsilí bylo vynaloženo na přípravu derivátů rozpustnějších ve vodě nebo organických rozpouštědlech. Velikost a tvar kavity byl přizpůsoben inkludovaným molekulám a byly připraveny molekuly, které mají specifické funkce. Příklady takovýchto molekul jsou například modely enzymů – regioselektivní modifikace umožnila přípravu metalo-CD s katalytickými funkcemi, atd. . Výroba těchto molekul je velmi obtížná, ale i přes to získala řada z nich využití v průmyslu, kde se vyrábí ve velkém množství (permethylované CD)⁴⁰.

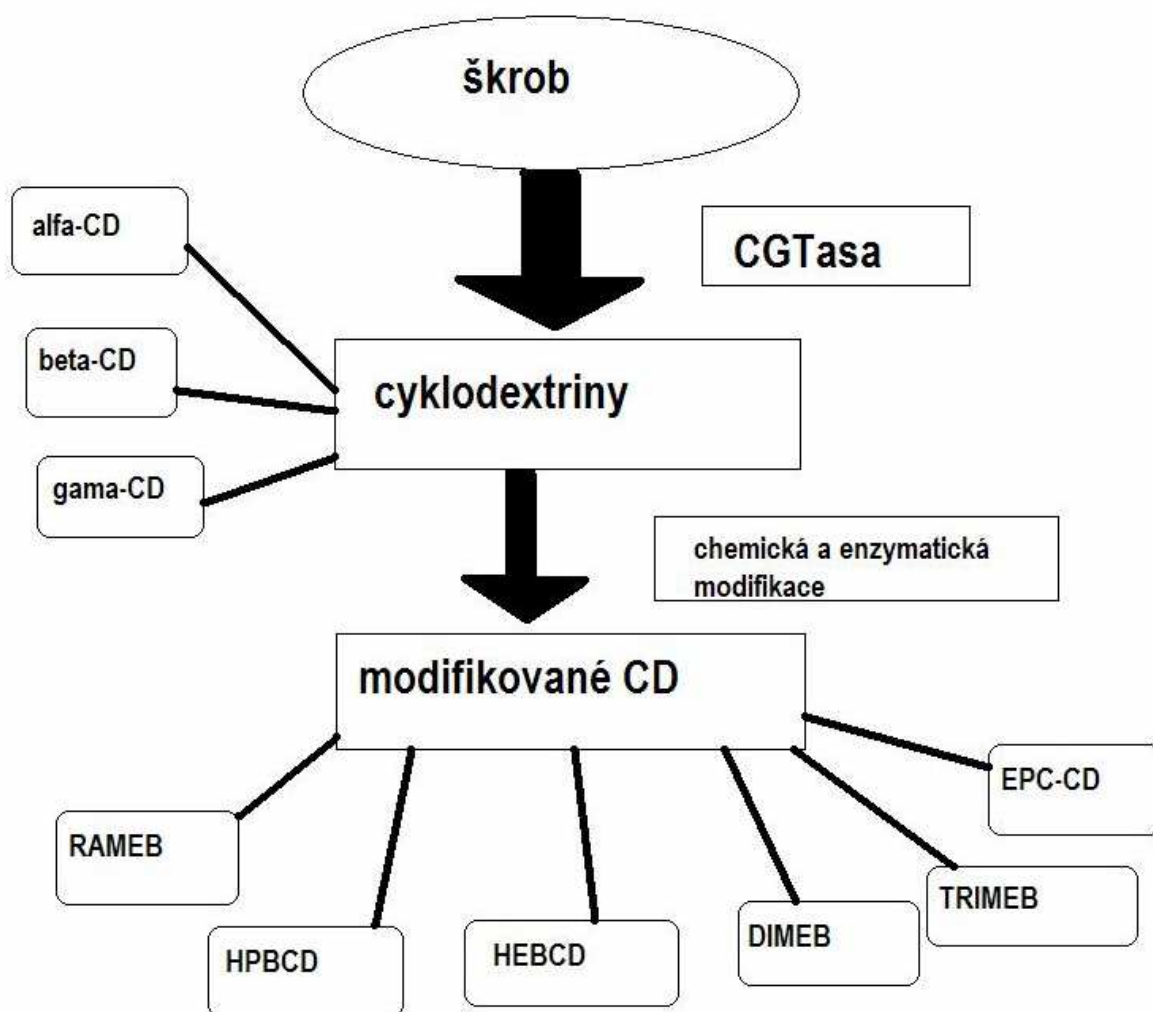
K modifikaci cyklodextrínu dochází až po vzniku nativního cyklodextrínu, což znamená, že se neprovádí během přípravy stavebních bloků před makrocyclizací. Nejběžnější reakcí je substituce na hydroxylové skupině. K dispozici máme na glukózové jednotce celkem tři skupiny lišící se reaktivitou (Obr.13)⁴⁰.



Obrázek 18: Reaktivní hydroxylové skupiny u glukózové jednotky cyklodextrínu⁴⁰

Primární hydroxylové skupiny (C6) jsou nejméně stericky bráněné a mají nejvyšší bazicitu, proto je možné provést selektivní substituci stericky objemným činidlem za přítomnosti slabé báze. Sekundární hydroxyly v poloze C2 mají nejvyšší kyselost ($pK_a \sim 12$). Selektivní alkylace nebo acylace je podpořena použitím ekvivalentu silné báze a

dipolárního aprotického rozpouštědla. Takto můžeme dosáhnout selektivní monosubstituce na C2, ovšem selektivní substituce všech hydroxylů na C2 je bez chránění primárních hydroxylů obtížně dosažitelná. Sekundární hydroxyly v poloze C3 jsou nejméně reaktivní a mohou být selektivně substituovány po reakci nebo dočasném chránění hydroxylů v poloze C2 a C6.⁴⁰



Obrázek 19: Schématické znázornění modifikace CD. RAMEB- náhodně methylovaný β -CD, HPBCD- hydroxypropyl- β -CD, HEBCD- hydroxyethyl- β -CD, DIMEB- heptakis(2,6-dimethyl)- β -CD, TRIMEB- heptakis(2,3,6-trimethyl)- β -CD, EPC-CD-CD sesíťený s epichlorhydrinem³⁴

Podle počtu monosubstituovaných glukozových jednotek je možno deriváty rozdělit na:

- a) monosubstituované, kde je jen jedna hydroxylová skupina makrocyklu je modifikována
- b) několikanásobně definovaně substituované, které poskytující jeden chemicky homogenní produkt
- c) persubstituované, kde je substituována celá sada hydroxylů jednoho typu, např. v poloze C6 nebo C2 a C6, atd.
- d) směsi statisticky substituovaných produktů⁴⁰

2.4.3 Chirální separace omeprazolu metodou CE

Následující práce, týkající se chirální separace omeprazolu, byly nalezeny v dostupné literatuře.

Nevodné prostředí

Velmi oblíbenými cyklodextríny pro separaci v bezvodém prostředí jsou sulfatované β -cyklodextríny. Jako příklad separace v nevodném prostředí lze uvést separaci *R*-omeprazolu a *S*-omeprazolu a jejich metabolitů *R*-5-hydroxyomeprazolu a *S*-5-hydroxyomeprazolu byl využit J. Olssonem a kol.⁴ heptakis-(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-sulfo)- β -cyklodextrín (HDMS- β -CD). Zásobní roztok analytů (omeprazol, 5-hydroxyomeprazol) byl připraven do směsi NaOH/MeOH kvůli zpomalení degradace omeprazolu. Jako pufr byl použit 30 mmol.l⁻¹ octan amonný + 1 mmol.l⁻¹ kyselina mravenčí v methanolu. Chirálním činidlem byl 40 mmol.l⁻¹ HDMS- β -CD rozpuštěný v MeOH při pH* = 4,82. Racemický roztok omeprazolu a jeho metabolitu byl úspěšně separován při 16°C a rozlišení jednotlivých píků nekleslo pod 1,8, ovšem při 20°C kleslo rozlišení pod 1,5.

Vodné prostředí

Z publikovaných prací, které byly prováděny ve vodném prostředí, lze jmenovat následující příklady separací.

Sulfatovaný cyklodextrín (S- β -CD) byl připraven P. S. Bonato a kol.³ jako 3% roztok v 20 mmol.l⁻¹ fosfátovém pufru o pH = 4. Využití neutrálních nebo nabitých, alkylovaných derivátů β -cyklodextrínů se neukázalo pro separaci racemického omeprazolu v tomto vodném prostředí úspěšné tolik, jako využití S- β -CD. Právě při použití S- β -CD,

vlnové délky detektoru 302 nm, teploty 20 °C a napětí 20 kV bylo dosaženo nejlepšího rozlišení ($R = 1,5$). Byla použita křemenná kapilára o celkové délce 60 cm a efektivní délce 53 cm s průměrem 50 μm .

U podobné separace J. J. B. Nevado a kol.⁴¹ použili 40 mmol.l^{-1} fosfátový pufr o $\text{pH} = 2,2$, methyl- β -CD, dimethyl- β -CD a hydroxypropyl- β -CD o různých koncentracích a 5 mmol.l^{-1} Na_2S jako antioxidant analytu při teplotě 16°C. Bylo použito napětí 15 kV pro všechny separace a roztok omeprazolu byl měřen při vlnové délce detektoru 301 nm v křemenné kapiláře o celkové délce 31 cm a efektivní délce 21 cm s průměrem 75 μm . Nejlepšího rozlišení separace ($R = 1,54$) bylo dosaženo při koncentraci 20 mmol.l^{-1} methyl- β -CD.

Další ze separací racemického omeprazolu, byla prováděna J. Olssonem a kol.⁴² metodou CE – MS. Nejprve byla použita CE s klasickým UV detektorem a vlnovou délkou 301 nm. Jako pufr byl použit octan amonný o $\text{pH} 5,8$ a koncentraci 10 mmol.l^{-1} , který byl dávkován ze zásobního roztoku o koncentraci 0,3 mol.l^{-1} a musel být uchován v lednici. Zvolené napětí bylo 15 kV a kapilára byla temperována na 16 °C. K separaci byl použit 15 mmol.l^{-1} heptakis-(6-sulfo)- β -CD (HS- β -CD). Celková délka kapiláry byla 75 cm a délka k detektoru 67 cm s průměrem 50 μm . Při těchto podmínkách a koncentraci analytu 1 mmol.l^{-1} bylo dosaženo rozlišení $R = 3,34$. Při použití ESI – MS byla použita také teplota 16 °C a pufr o koncentraci 10 mmol.l^{-1} , ale napětí bylo zvýšeno na 23 kV, koncentrace HS- β -CD byla 5 mmol.l^{-1} a koncentrace analytu byla 2 mmol.l^{-1} . Celková délka kapiláry byla stejná jako délka k detektoru, což bylo 50 cm, ale průměr zůstal stejný. Separace za užití CE – MS byla za těchto podmínek lepší, z hlediska hodnoty RSD, nicméně vyskytly se problémy s kontaminací MS detektoru zejména kvůli použitému cyklodextrínu, který zanášel MS.

Mezi chirální selektory, které se dají použít na separaci omeprazolu, patří kromě CD i bovinní sérový albumin (BSA). V další publikované práci využili D. Eberle a kol.⁴³ právě BSA na separaci omeprazolu a jeho dvou derivátů lamzoprazolu a sodné soli pantoprazolu metodou CE. Jako elektrolyt byl zvolen fosforečnan draselný o $\text{pH} 7,4$, koncentraci 30 mmol.l^{-1} a s přídavkem 5 % 1-propanolu. Byla použita křemenná kapilára o celkové délce 66 cm, efektivní délce 50 cm a průměru 50 μm . Napětí bylo zvoleno tak, aby byl udržován konstantní proud 35 μA . Ukázalo se, že při použití 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ bylo pro pantoprazol dosaženo rozlišení 1,5, zatímco při 40 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ BSA bylo rozlišení 1,9.

Rozlišení omeprazolu a lamzoprazolu při této koncentraci BSA, za stejných podmínek separace, bylo rovno jedné.

2.4.4 Separace omeprazolu v jiných separačních technikách

Následující chirální separace omeprazolu, které jsou zde popsány, byly prováděny pomocí chromatografických metod. Pro separaci omeprazolu využili R. M. Orlando a P. S. Bonato⁴⁴ kolony Chiralpak AD – RH, Chiralpak AD nebo Chiralpak OD – H. Separace byla prováděna v různých mobilních fázích při teplotě 23 ± 2 °C, vlnové délce 302 nm a s konstantním průtokem 0,5 ml/min v kolonách Chiralpak AD – RH a Chiralpak AD. V koloně Chiralpak OD – H byl použit průtok 1,5 ml / min. Jako zdroj omeprazolu byla využita lidská plazma, ze které byl omeprazol získán metodou SPE. Nejlépe se omeprazol separoval v koloně Chiralpak AD, s mobilní fází ethanol / hexan (70:30, v / v), kde bylo dosaženo rozlišení enantiomerů 4,30 a hodnota α byla 1,31. V ostatních kolonách byl α podobný, ale rozlišení bylo nižší ($R_{\text{Chiralpak AD – RH}} = 1,18$, $R_{\text{Chiralpak OD – H}} = 1,80$).

V práci, kterou publikoval L. Toribio a kol.⁴⁵, byla použita superkritická fluidní chromatografie a kolona Chiralpak AD. Byl sledován vliv teploty a vliv organického modifikátoru na separaci omeprazolu a jeho derivátů. Jako organický modifikátor byl zvolen methanol, ethanol, 2-propanol a acetonitril. Nejlepšího rozlišení bylo dosaženo při průtoku 2 ml/min, tlaku 20 MPa, teplotě 35 °C a koncentraci modifikátoru 30%. Bylo zjištěno, že nejlépe ovlivní rozlišení enantiomerů omeprazolu methanol a ethanol, zatímco vliv 2-propanolu na rozlišení je malý. Použití acetonitrilu není příliš vhodné, jelikož doba analýzy stoupne nad 60 minut. Ve zbývajících organických modifikátorech se čas analýzy pohyboval pod 30 min a rozlišení v methanolu bylo 9,9, v ethanolu 6,2 a v 2-propanolu 2,9. Bez použití modifikátoru bylo R větší než 2 a doba analýzy trvala méně než 10 minut.

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

V této práci byl použit $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 , H_3PO_4 , NaOH a N,N – dimethylformamid, vše p. a. (Lachema, Neratovice, ČR). Dále byl použit roztok NaOH o koncentraci 1 mol.l^{-1} a komerční borátový pufr o pH 9,44, oboje p. a. (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA). Jako analyt byl zvolen omeprazol (Esteve Quimica, S.A., Barcelona, Španělsko) a Helicid 40 INF (Zentiva a.s., Praha, ČR). Cyklodextríny použité k chirální separaci byly dichlorid mono-6-deoxy-6- N,N,N',N',N' -pentamethylethylendiammoniocyklomaltoheptaosy (PEMEDA- β -CD), dichlorid mono-6-deoxy-6- N,N,N',N',N' -pentamethylethylendiammoniocyklomaltohexaosy (PEMEDA- α -CD), mono 2'-O-karboxymethyl- β -cyklodextrín (2'-KM- β -CD), mono 3'-O-karboxymethyl- β -cyklodextrín (3'-KM- β -CD) a mono 6'-O-karboxymethyl- β -cyklodextrín (3'-KM- β -CD) připravené doc. RNDr. Jindřichem, CSc. z katedry organické a jaderné chemie, PřF UK.

3.2 Přístroje a pomůcky

Přístroj CE je komerční výroby: Capillary electrophoresis, Agilent 7100, vyrobený firmou Agilent technologies, USA a dodaný v rámci projektu Norway Grants. Jeho součástí je DAD UV detektor 190 nm – 400 nm, kazeta obsahující křemennou kapiláru o průměru 50 μm , chlazení kazety, autosampler, zdroj vysokého napětí 0 – 30 kV, vzduchová pumpa, PC obsahující software ChemStation B.04.02 sloužící pro ovládání i vyhodnocení elektroferogramů spojené pomocí LAN s CE a operační systém Windows XP (SP3). Dále byla použita ultrazvuková lázeň Ultrasonic LC30H (Německo) a analytické váhy – Precisa Instrument 290SCS (Precisa, Dietikon, Švýcarsko).

Deionizovaná voda byla odebírána z přístroje Millipore (Milli – Q plus System, USA) a kontrola pH byla prováděna na pH metru (Conductivity and pH meter firmy Jenway, VB)

3.3 Příprava roztoků

3.3.1 Omeprazol

Zásobní roztok omeprazolu byl připraven o koncentraci 20 mmol.l^{-1} a použité rozpouštědlo bylo N,N-dimethylformamid (DMF). Omeprazol je v DMF relativně stabilní, avšak i přes uchovávání v lednici docházelo k jeho degradaci. To se projevilo na elektroferogramu změnou počtu píků a také změnou barvy roztoku. Bylo tedy nutné připravit čerstvý roztok jednou za 14 dní.

Koncentrace analytu byla zvolena taková, aby se dal omeprazol snadno detegovat, ale zároveň taková, aby při případném rozdělení enantiomerů došlo k co nejlepšímu rozlišení jednotlivých píků. Experimentálně byla koncentrace $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$ určena jako vhodná. Ze zásobního roztoku bylo pipetováno $2,5 \mu\text{l}$ a doplněno na $500 \mu\text{l}$ deionizovanou vodou. Při použití Helicidu bylo dávkováno množství odpovídající koncentraci analyzovaného omeprazolu.

3.3.2 Pufry

Pufry byly připraveny o různé koncentraci s ohledem na elektrický proud limitující vkládané napětí. Jejich pH bylo 3,08, 5,10, 7, 9,44 a 11,1.

Pro pH = 3,08, 5,1 a 7 byly připraveny fosforečnanové pufry (přesný objem H_3PO_4 byl upraven 1 mol.l^{-1} roztokem NaOH). Pufry o pH 3,08 a 5,1 měly koncentraci 40 mmol.l^{-1} a pufr o pH 7 měl koncentraci 20 mmol.l^{-1} .

Pro pH = 9,44 byl využit komerčně dodaný borátový pufr firmou Agilent technologies o koncentraci 20 mmol.l^{-1} .

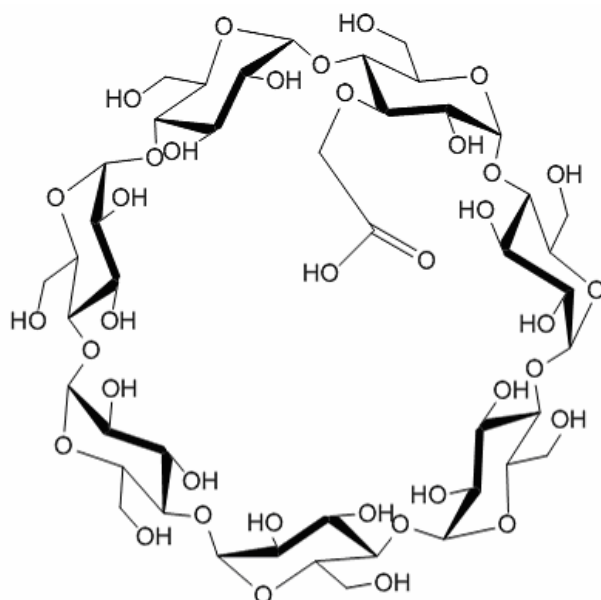
Pro pH 11,1 byl připraven fosforečnanový pufr (navážka pevného $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, pH bylo upraveno 1 mol.l^{-1} roztokem NaOH) o koncentraci 4 mmol.l^{-1} .

Jako separační roztoky (elektrolyty) byly použity jednotlivé pufry (nebo směs pufr + CD) a jednotlivé koncentrace byly zvoleny tak, aby proud procházející kapilárou nepřesáhl hodnotu $100 \mu\text{A}$ při použitém napětí.

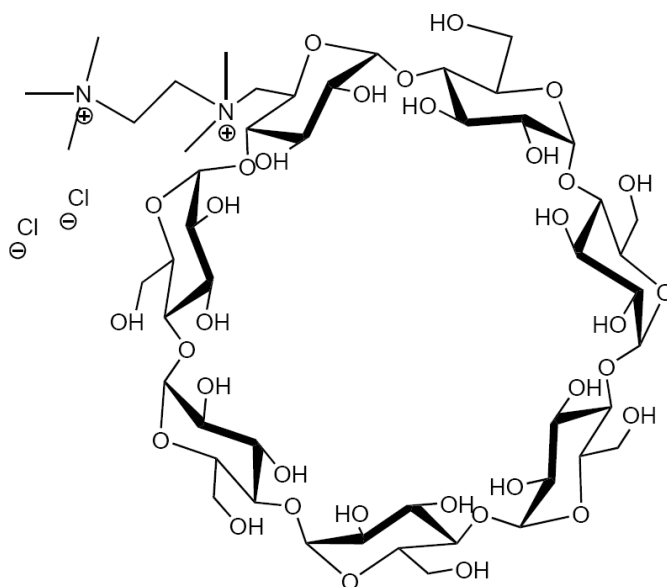
3.3.3 Cyklodextríny

Pevné cyklodextríny byly rozpuštěny v deionizované vodě a vzniklé zásobní roztoky byly uchovávány v lednici. Jednotlivé cyklodextríny byly pipetovány ze zásobních roztoků přímo do vialek s roztoky pufrů, tak aby koncentrace cyklodextrínu odpovídala požadované koncentraci a zároveň, aby se příliš nezředil separační pufr.

Bylo nutné zajistit rychlé spotřebování rozpuštěného CD a co nejkratší skladování v lednici. Důvodem bylo plesnivění roztoků CD. Na obrázcích 20 a 21 jsou zobrazeny struktury dvou použitých cyklodextrínů. Strukturní vzorec 3'-KM- β -CD je podobný pro zbylé dva KM- β -CD, jen se liší polohou substituované skupiny. Na obrázku 21 je PEMEDA- β -CD, který má o jednu glukopyranosovou jednotku víc, než PEMEDA- α -CD.



Obrázek 20: Strukturní vzorec mono 3'-O-karboxymethyl- β -cykoodextrínu



Obrázek 21: Strukturní vzorec dichloridu mono-6-deoxy-6-N,N',N',N'-pentamethylethylendiammoniocyklomaltoheptaosy

3.4 Podmínky měření a postup práce

Jako ukazatel elektroosmotického toku byl užit DMF, ve kterém byl rozpuštěn vzorek.

Jako analyt byl použit racemický roztok omeprazolu o koncentraci $0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$, který byl dávkován po dobu 5 s přetlakem 50 mbar.

Na všechna měření bylo použito napětí 25 kV s postupným zvyšováním na začátku analýzy (0 - 25 kV/0,1 min), křemenná kapilára potažená polyimidem o průměru $50 \text{ }\mu\text{m}$ s celkovou délkou 48,5 cm a efektivní délkou 40 cm.

Vždy před zahájením analýz byla kapilára propláchnuta roztokem 1 mol.l^{-1} NaOH po dobu 10 minut, 3 minuty deionizovanou vodou a 5 minut pufrém. Potom byl použit separační pufr bez přídavku CD. Během dalších analýz zahrnujících užití CD byla koncentrace CD v pufru postupně zvyšována od nejnižší po nejvyšší. Před použitím pufru s vyšší koncentrací CD byla kapilára promyta právě tímto pufrém s vyšším obsahem CD po dobu 3 min. Takto sbylo postupováno v každém pufru.

Při změně pufru bylo postupováno jako před začátkem analýzy, tedy kapilára byla promyta nejprve NaOH, poté vodou a nakonec pufrém za použití stejných časů.

Důkladné promytí, popřípadě vyčištění zanesené kapiláry bylo obvykle prováděno 45 minut $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ HCl, potom 2 minuty deionizovanou vodou a dalších 45 minut 1 mol.l^{-1} NaOH.

Měření byla prováděna při několika vlnových délkách a to při 202, 220, 230, 240, 260, 280 a 303 nm. Hlavním důvodem byly odlišná absorpční maxima omeprazolu a DMF. Omeprazol absorboval při vlnových délkách od 240 nm výše a nejvíce při 303 nm. DMF absorboval v nízkých vlnových délkách od 202 – 240 nm, ovšem při 202 nm absorboval nejvíce. Při 240 nm bylo možné pozorovat omeprazol i DMF, ale tato vlnová délka byla z hlediska nižší absorbce vhodná spíše pro kvalitativní vyhodnocení. Vlnová délka pro detegování omeprazolu byla určena experimentálně a potvrzena v publikované literatuře^{3,4}.

3.5 Vyhodnocení výsledků

Rozlišení

Rozlišení mezi dvěma píky R lze vypočítat ze vztahu (4), kde t_{mig} je migrační čas a w je šířka píku při základně. Migrační časy i šířky píku při základně byly vyhodnoceny a spočítány pomocí CE softwaru.

$$R_{1,2} = \frac{2(t_{mig,2} - t_{mig,1})}{w_{t,1} + w_{t,2}} \quad (4)$$

Efektivní mobilita

Efektivní mobilitu $m_{ef,i}$ analytu vypočítáme ze vztahu (5), kde t_{eof} je migrační čas elektroosmotického toku (neutrálního analytu), $t_{mig,i}$ je migrační čas analyti i , l_d je délka kapiláry k detektoru, l_c je celková délka kapiláry a U je napětí.

$$m_{ef,i} = \left(\frac{1}{t_{mig,i}} - \frac{1}{t_{eof}} \right) \cdot \frac{l_d \cdot l_c}{U} \quad (5)$$

Separční faktor

Separční faktor α vypočítáme ze vztahu (6) jako poměr migračních časů $t_{mig,i}$ jednotlivých enantiomerů v chirální separaci.

$$\alpha = \frac{t_{mig,2}}{t_{mig,1}} \quad (6)$$

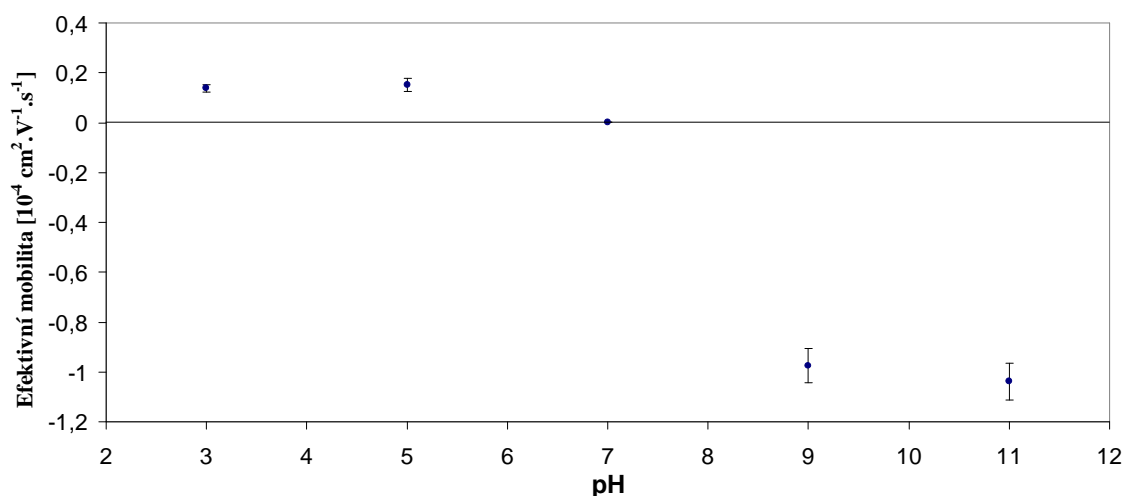
Statistické vyhodnocení bylo prováděno v programu Microsoft Excel, kde byl spočítán průměr a směrodatná odchylka. Relativní směrodatná odchylka byla vypočítána jako poměr směrodatné odchylky a průměru.

4 Výsledky a diskuze

Ve všech dále uváděných grafech jsou jednotlivé body spojené přímkami, i když je jasné, že nemusí charakterizovat opravdový průběh závislosti. V textu jsou přesné hodnoty uvedené v tabulkách a pro lepší názornost jsou jednotlivé efektivní mobility omeprazolu i v obrázcích. Píky enantiomerů omeprazolu jsou značeny A a B, protože z racemického roztoku nebylo možno bez jednotlivých standardů určit, který pík je *R*-omeprazol a který esomeprazol. Z literatury je možné odvodit, že první pík, tedy pík s kratším migračním časem by měl být *S*-omeprazol⁴.

4.1 Separace omeprazolu bez přídavku cyklodextrínů

Z obrázku 22 je patrná závislost ionizace omeprazolu na použitém pH. Omeprazol je v bazickém prostředí nabitý záporně a v kyselém naopak kladně. Hodnoty pK_a omeprazolu se uvádí mezi 4 a 8,8^{13,14,15}. Z toho a z naměřených výsledků plyne, že omeprazol má izoelektrický bod pI, jehož hodnota je přibližně 7.



Obrázek 22. Závislost efektivní mobility omeprazolu na pH bez přídavku CD

V tabulce 2 jsou uvedeny relativní směrodatné odchylky efektivních mobilit v různých pH a z jejich hodnot vyplývá, že k nejmenší odchylce došlo v pH 9,44 a 11,1, naopak v kyselém prostředí došlo k odchylce větší. Z výsledků tedy plyne, že v zásaditých pufrch dochází k relativně menšímu rozptylu výsledků.

V pufrch bez přídavku cyklodextrínů nedošlo k chirální separaci enantiomerů omeprazolu.

Tabulka 2. Hodnoty efektivních mobilit omeprazolu, jejich směrodatné odchylky a relativní směrodatné odchylky pufrch bez CD

Hodnota pH / druh pufru (koncentrace, mmol.l^{-1})	efektivní mobilita $[10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	SD $[10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}]$	RSD [%]
3 / fosfátový (40)	0,138	0,015	10,88
5 / fosfátový (40)	0,153	0,026	17,06
7 / fosfátový (20)	0,000	0,000	0,00
9 / borátový (40)	-0,974	0,068	6,93
11 / fosfátový (4)	-1,038	0,073	7,03

4.2 Separace enantiomerů omeprazolu pomocí mono 6'-O-KM-β-CD

Mono 6'-O-karboxymethyl-β-cyklodextrín (6'-O-KM-β-CD) je díky karboxylové skupině v kyselém prostředí neionizovaný, nemá náboj. V zásaditém prostředí se chová jako slabá kyselina a odštěpuje H^+ . Omeprazol je v zásaditém pH také ionizovaný a má záporný náboj. Separace byla prováděna v pufrch o pH = 3,08, 5,1 a 9,44 a to z následujících důvodů. Při pH 9 byly obě molekuly (CD i omeprazol) záporně nabitě, nebylo však jasné jaké je procentuální zastoupení ionizovaných molekul, takže bylo nutné separaci experimentálně provést, i když předem bylo pravděpodobné, že nevznikne inkluzní komplex. V kyselém pH byl sice CD neutrální, ale omeprazol kladně nabitý, takže se dal očekávat snadnější vznik inkluzního komplexu.

4.2.1 Separace v borátovém pufru o pH 9,44

V borátovém pufru při použití mono 6'-O-KM- β -CD nedošlo k separaci omeprazolu. Po přidání 1 mmol.l⁻¹ CD do pufru došlo k nepatrnému zvýšení migračních časů EOF i omeprazolu, ve srovnání s pufrům bez CD. Tyto zvýšené migrační časy se s rostoucí koncentrací CD snižovaly, až klesly pod hodnotu migračních časů omeprazolu a EOF v pufru bez CD (tabulka 3).

Změny migračních časů se na změně efektivní mobility projeví jen minimálně. Po přidání cyklodextrínu (0 mmol.l⁻¹ CD \rightarrow 1 mmol.l⁻¹ CD) do čistého pufru došlo k snížení efektivní mobility, stejně jako k tomu došlo při přechodu z koncentrace CD 3 mmol.l⁻¹ na 5 mmol.l⁻¹ (tabulka 4). Efektivní mobility, jak vidíme z obrázku 23, se příliš neliší.

Tabulka 3. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v různých koncentracích 6'-O-KM- β -CD v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹

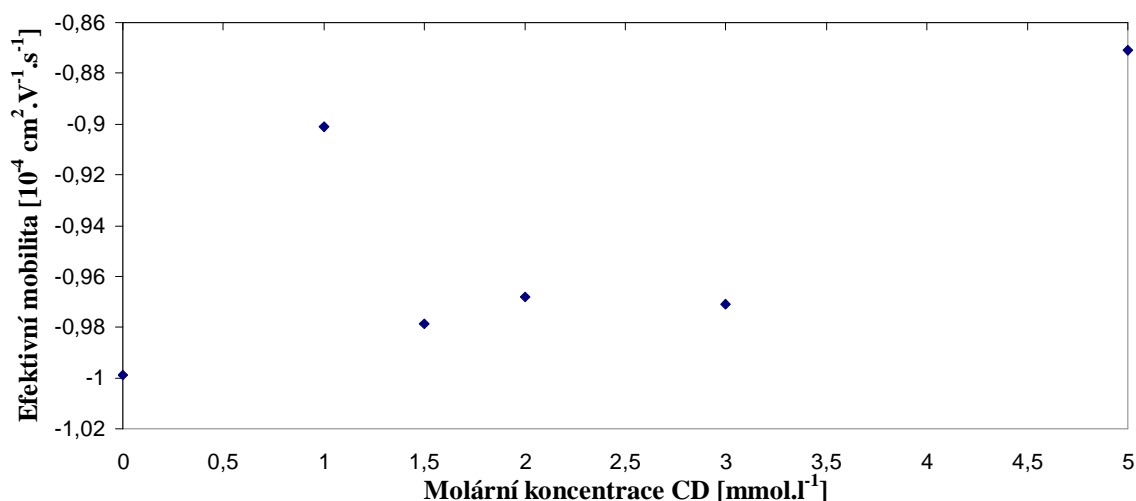
c_{CD} [mmol.l⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	N₁	R_{1,2}	α
0	2,642	3,333	28872	-	-
1,0	2,739	3,387	29086	-	-
1,5	2,636	3,292	26061	-	-
2,0	2,562	3,169	27580	-	-
3,0	2,413	2,947	23629	-	-
5,0	2,421	2,892	23022	-	-

Tabulka 4. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu v borátovém pufru o pH 9,44 s 6'-O-KM- β -CD a koncentraci 20 mmol.l⁻¹.

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	μ_{e1} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]
0	-0,999	0,067	6,66
1,0	-0,901	0,084	9,32
1,5	-0,979	0,026	2,69
2,0	-0,968	0,066	6,83
3,0	-0,971	0,038	3,96
5,0	-0,871	0,053	6,06

Tento cyklodextrín navíc zanášel postupně kapiláru, což se projevvalo na elektroferogramech, kde se postupem času objevovaly nové, dříve neviděné píky a postupně se zvyšoval jejich počet, až došlo k celkovému smytí píků, zvýšení odezvy signálu a nemožnosti identifikovat píky analytu nebo EOF. Kapilára musela být z tohoto důvodu promývána roztoky NaOH a HCl a to mnohem častěji, než u předchozích cyklodextrínů.

Pokud byl tento jev způsoben alespoň částečným ulpíváním CD na vnitřní stěně kapiláry, mohlo by to vysvětlit urychlení EOF a analýzy s postupně se zvyšující koncentrací CD, který byl v tomto pH záporně nabitý.



Obrázek 23: Závislost efektivní mobility omeprazolu na koncentraci mono 6'-O-KM-β-CD v borátovém pufru o pH = 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹

4.2.2 Separace ve fosfátovém pufru o pH 5,1

V kyselém prostředí nedošlo k separaci enantiomerů omeprazolu, i přes to, že by cyklodextrín mohl tvořit s omeprazolem snáze inkluzní komplex. Z obrázku 24 je vidět, že efektivní mobilita klesá s rostoucí koncentrací CD až na nulu. Zde došlo ke koeluci DMF a nabitého omeprazolu za přispění nenabitého cyklodextrínu, takže se můžeme domnívat, že k jisté interakci obou molekul došlo. Zda-li došlo k tvorbě inkluzního komplexu z výsledků není jasné. Možné je, že ke vzniku komplexu došlo, ale ne natolik silného, aby došlo i k separaci jednotlivých enantiomerů.

V tabulce 6 jsou uvedeny jednotlivé efektivní mobility, včetně jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek, které jsou poměrně vysoké. Důvodem může být jako v předchozím případě (kapitola 4.3.1) zanášení kapiláry cyklodextrínem.

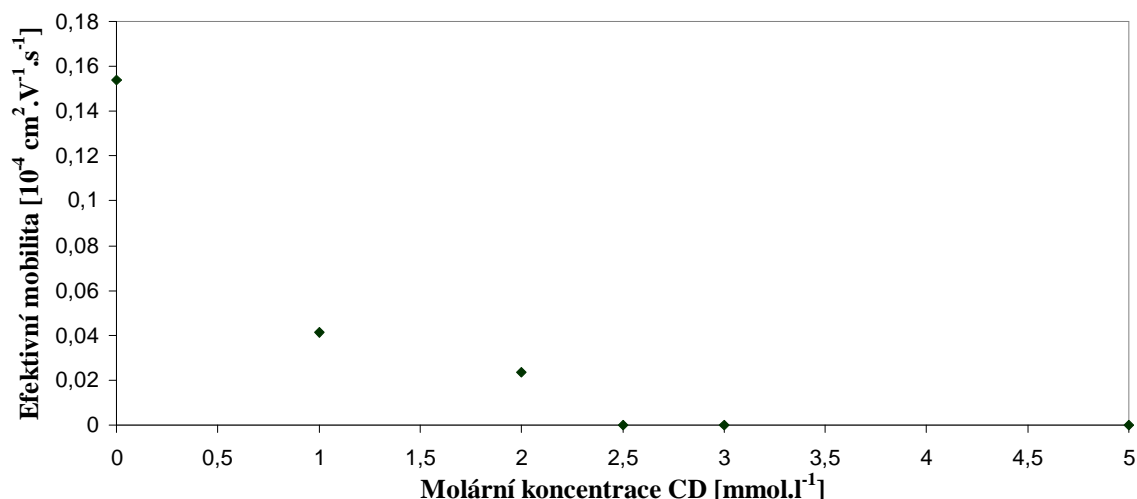
V tabulce 5 vidíme velice podobný trend změny migračních časů jako v tabulce 3. Tento jev byl popsán rovněž v předchozí kapitole.

Tabulka 5. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v různých koncentracích mono 6'-O-KM- β -CD ve fosfátovém pufru o pH = 5,1 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	N₁	R_{1,2}	α
0	3,885	3,885	32882	-	-
1,0	4,206	4,150	15501	-	-
2,0	3,467	3,445	36026	-	-
2,5	3,283	3,283	30938	-	-
3,0	3,108	3,108	13210	-	-
5,0	2,870	2,870	11748	-	-

Tabulka 6. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu v různých koncentracích mono 6'-O-KM- β -CD ve fosfátovém pufru o pH = 5,1 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	μ_{e1} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]
0	0,154	0,013	8,25
1,0	0,041	0,003	8,00
2,0	0,023	0,002	9,96
2,5	0,000	0,000	-
3,0	0,000	0,000	-
5,0	0,000	0,000	-



Obrázek 24: Závislost efektivní mobility omeprazolu na koncentraci mono 6'-O-KM-β-CD ve fosfátovém pufru o pH = 5,10 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹

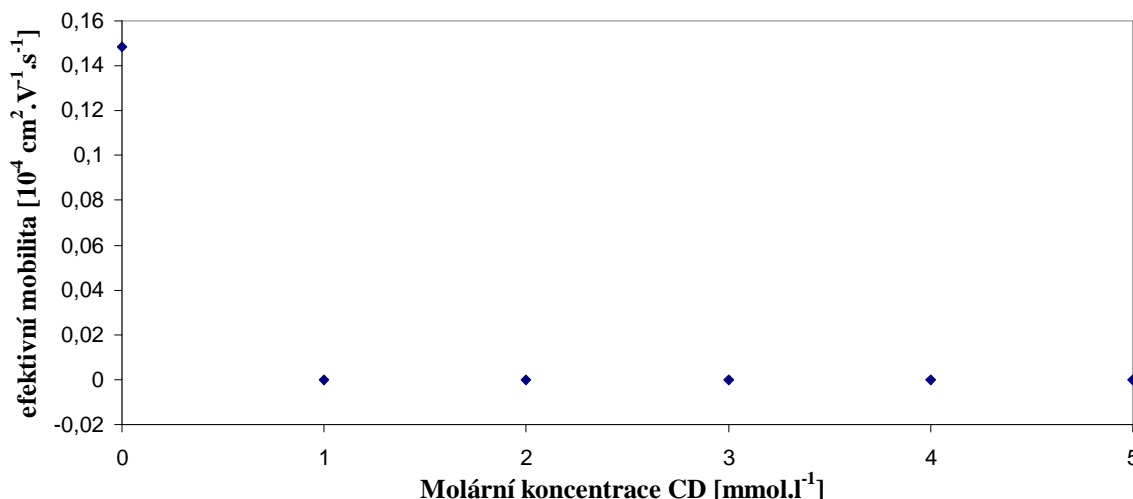
4.2.3 Separace ve fosfátovém pufru o pH 3,08

V pH 3,08, stejně jako v pH 5,1, nedošlo k separaci omeprazolu pomocí 6-O'-KM-β-CD. Jak můžeme vidět z obrázků 24 a 25, efektivní mobilita při nulové koncentraci CD byla velmi podobná v obou pH. V pufru o pH 3,08 došlo k prudšímu poklesu efektivní mobility a její hodnota byla nulová už při 1 mmol.l⁻¹ CD. Příčinou může být stupeň ionizace omeprazolu. Změna migračních časů s rostoucí koncentrací cyklodextrínu (tabulka 7) má podobný průběh jako v předchozím separačním pufru, až na mírnější pokles migračních časů píků omeprazolu a EOF. Hodnoty migračních časů v pH 5,1 se pohybovaly okolo 3 minut, zatímco v pH 3,08 se pohybují okolo 4,5 minuty.

Tabulka 7. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v různých koncentracích mono 6'-O-KM-β-CD ve fosfátovém pufru o pH = 3,08 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l ⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	N_1	$R_{1,2}$	α
0	4,516	4,294	60230	-	-
1	4,692	4,692	36710	-	-
2	4,608	4,608	37546	-	-
3	4,595	4,595	34589	-	-
4	4,571	4,571	35869	-	-
5	4,553	4,553	36985	-	-

Hodnota efektivní mobility μ_{el} při nulové koncentraci CD je rovna $0,148 \pm 0,014 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ a $\text{RSD} = 9,14$. Pro koncentrace CD od 1 – 5 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ je efektivní mobilita rovna nule.



Obrázek 25: Závislost efektivní mobility omeprazolu na koncentraci mono 6'-O-KM- β -CD ve fosfátovém pufru o $\text{pH} = 3,08$ a koncentraci $40 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$

4.3 Separace enantiomerů omeprazolu pomocí mono 3'-O'-KM- β -CD

Mono 3'-O-karboxymethyl- β -cyklodextrín (3'-O-KM- β -CD) by měl mít velmi podobné vlastnosti jako předešlý 6'-O-KM- β -CD, proto jsem pro separaci omeprazolu zvolil stejné nebo velmi podobné podmínky.

4.3.1 Separace v borátovém pufru o $\text{pH} 9,44$

V tomto pufru byla závislost měřena jen do $2 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ CD. Důvod byl ten, že se cyklodextrín patrně adsorboval na vnitřní stěně kapiláry. Projevovalo se to tím, že se postupně během jedné analýzy zvyšovala odezva detektoru a hodnota základní linie pozvolna stoupala. Zvláštností byl fakt, že k tomuto jevu došlo na vlnové délce, kde absorbuje nebo začíná absorbovat omeprazol, nikoliv na vlnové délce nižší než 240 nm , kde omeprazol neabsorbuje. Lze z toho vyvodit, že pravděpodobně došlo k nějaké interakci mezi CD a omeprazolem. Na elektroferogramu se objevili dva píky, které byly ovlivněné

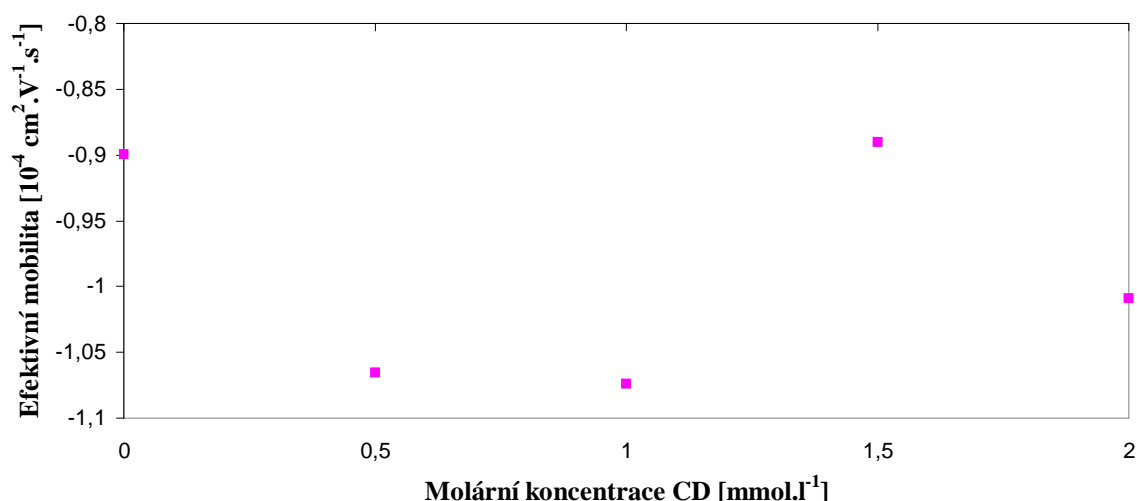
vzrůstající základní linií. Z tabulky 8 a 9 není vidět žádná závislost spojená s rostoucí koncentrací, snad až na prudce klesající počet teoretických pater, což je logické, když uvažujeme změnu základní linie.

Tabulka 8. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v různých koncentracích mono 3'-O-KM- β -CD v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	N₁	R_{1,2}	α
0	3,145	4,032	19169	-	-
0,5	3,261	4,458	5465	-	-
1,0	3,555	5,044	3564	-	-
1,5	3,512	4,633	1194	-	-
2,0	3,563	4,935	1965	-	-

Tabulka 9. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu v borátovém pufru s mono 3'-O-KM- β -CD o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	μ_{e1} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]
0	-0,899	0,020	2,201
0,5	-1,065	0,020	1,895
1,0	-1,074	0,038	3,547
1,5	-0,890	0,079	8,923
2,0	-1,009	0,010	1,036



Obrázek 26: Závislost efektivní mobility omeprazolu na koncentraci mono 3'-O-KM-β-CD v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹

4.3.2 Separace ve fosfátovém pufru o pH 5,1

V tomto pH docházelo mnohem více k zanášení kapiláry cyklodextrínem, oproti předchozímu pufru. Projevovalo se to zejména při vyšších koncentracích, kde výsledné elektroferogramy nebylo možné interpretovat. Velmi důležité bylo kapiláru promývat kombinací roztoků HCl a NaOH. To se v případě použité koncentrace CD nad 1 mmol.l⁻¹ muselo provádět téměř po každé analýze. Často nebylo možné opakovaně změřit jeden a tentýž vzorek v té samé koncentraci.

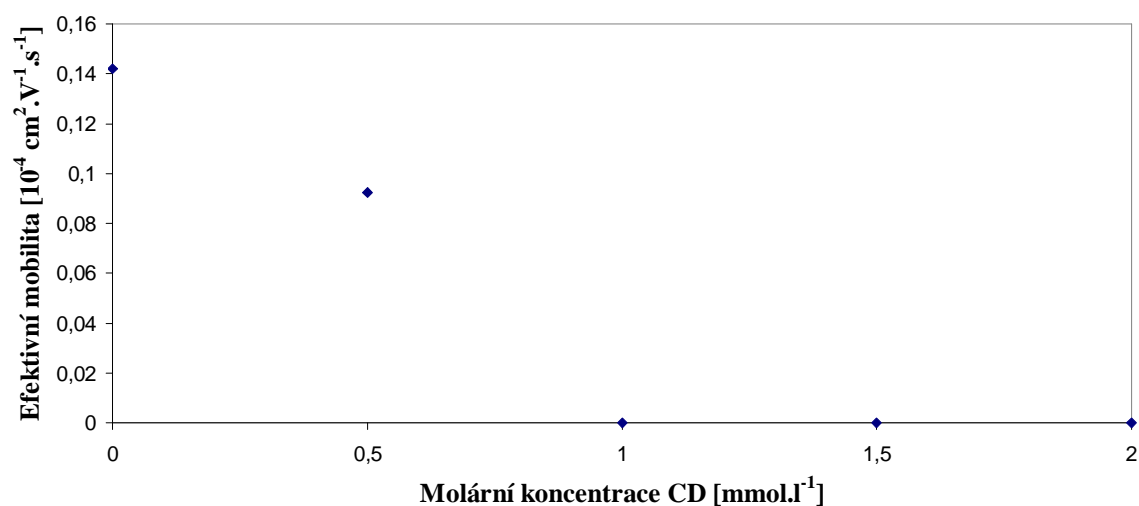
Migrační časy koeluujícího omeprazolu a DMF se při koncentraci CD 1,5 a 2 mmol.l⁻¹ prudce snížili, stejně jako počet teoretických pater.

Tabulka 10. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v různých koncentracích mono 3'-O-KM-β-CD ve fosfátovém pufru o pH = 5,1 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	N₁	R_{1,2}	α
0	4,231	4,038	22012	-	-
0,5	5,476	5,270	14359	-	-
1,0	5,080	5,080	4602	-	-
1,5	1,744	1,744	6862	-	-
2,0	1,381	1,381	4084	-	-

Tabulka 11. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu ve fosfátovém pufru s mono 3'-O-KM-β-CD o pH 5,1 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l ⁻¹]	μ_{e1} [10 ⁻⁴ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]	SD [10 ⁻⁴ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]	RSD [%]
0	0,142	0,013	9,14
0,5	0,092	0,003	3,51
1,0	0	0	-
1,5	0	0	-
2,0	0	0	-



Obrázek 27: Závislost efektivní mobility omeprazolu na koncentraci mono 3'-O-KM-β-CD ve fosfátovém pufru o pH = 5,10 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹.

4.3.3 Separace ve fosfátovém pufru o pH 3,08

V takto kyselém pH nebylo možné spolehlivě interpretovat výsledné elektroferogramy už od koncentrace CD 0,5 mmol.l⁻¹. Výsledky se nepodařilo získat, ani po sáhodlouhém promývání kapiláry roztoky NaOH a HCl, proto jsou v tabulkách 12 a 13 značeny křížkem X.

Ze zatím použitých CD byl tento spolehlivě nejnevhodnější pro tuto konkrétní separaci.

Tabulka 12. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v různých koncentracích mono 3'-O-KM-β-CD ve fosfátovém pufru o pH = 3,08 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	N₁	R_{1,2}	α
0	6,778	6,354	39912	-	-
0,5	9,098	8,876	3369	-	-
1,0	X	X	X	-	-
1,5	X	X	X	-	-
2,0	X	X	X	-	-

Tabulka 13. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu ve fosfátovém pufru s mono 3'-O-KM-β-CD o pH 3,08 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	μ_{e1} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]
0	0,127	0,007	5,62
0,5	0,035	0,003	7,29
1,0	X	X	X
1,5	X	X	X
2,0	X	X	X

4.4 Separace enantiomerů omeprazolu pomocí mono 2'-O'-KM-β-CD

Mono 2'-O-karboxymethyl-β-cyklohextrín (2'-O-KM-β-CD) by měl mít velmi podobné vlastnosti jako předešlý 3'-O-KM-β-CD (karboxymethylová skupina na stejné straně kavity), proto jsem pro separaci omeprazolu zvolil stejné nebo velmi podobné podmínky.

4.4.1 Separace v borátovém pufru o pH 9,44

V tomto separačním mediu nedošlo k separaci omeprazolu, stejně jako tomu bylo u ostatních KM-β-CD v borátovém pufru o pH 9,44. S rostoucí koncentrací CD došlo

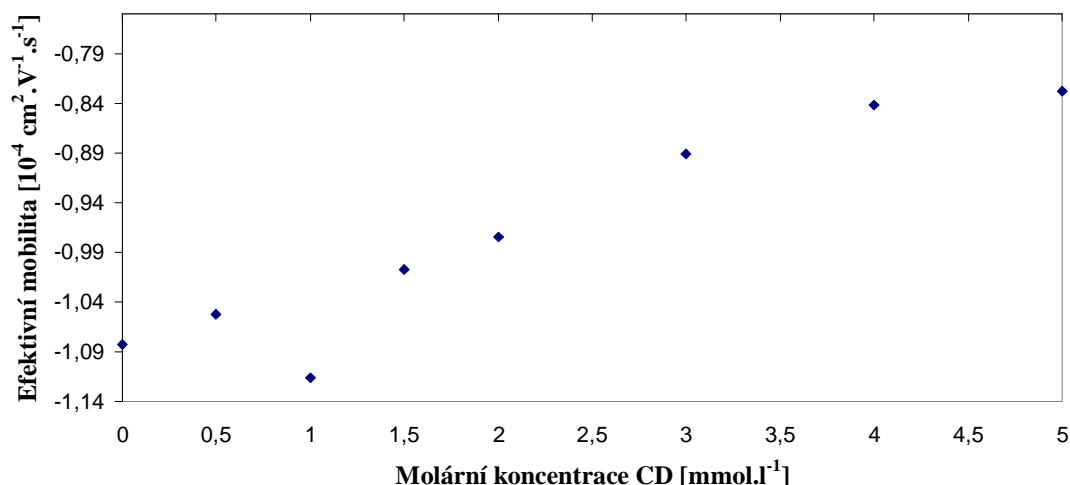
k mírnému nárůstu migračních časů píků EOF a omeprazolu a k mírnému poklesu efektivní mobility (tabulky 14, 15). U migračního času se jednalo spíše o vzestupný trend, než o pravidlo přímé úměry, protože můžeme nalézt výjimky (menší poklesy časů). Efektivní mobilita s rostoucí koncentrací klesá pravidelně, až na výjimku při koncentraci 1 mmol.l⁻¹.

Tabulka 14. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹ s přidavkem 2'-O-KM-β-CD

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	N₁	R_{1,2}	α
0	2,443	3,072	29509	-	-
0,5	2,414	3,003	26712	-	-
1,0	2,420	3,059	23012	-	-
1,5	2,560	3,197	24528	-	-
2,0	2,520	3,111	18485	-	-
3,0	2,605	3,175	6936	-	-
4,0	2,654	3,209	11547	-	-
5,0	2,722	3,296	13250	-	-

Tabulka 15. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹ s přidavkem 2'-O-KM-β-CD

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	μ_{e1} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]
0	-1,082	0,043	3,95
0,5	-1,053	0,056	5,33
1,0	-1,112	0,076	6,86
1,5	-1,007	0,011	1,11
2,0	-0,975	0,047	4,85
3,0	-0,891	0,035	3,97
4,0	-0,842	0,002	0,21
5,0	-0,828	0,047	5,68



Obrázek 28: Závislost efektivní mobility omeprazolu na koncentraci 2'-O-KM-β-CD v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹

4.4.2 Separace ve fosfátovém pufru o pH 5,10

V tomto separačním pufru došlo k zajímavému úkazu. Nejprve se hodnota efektivní mobility spolumigrujících omeprazolu a DMF snižovala na nulu, které dosáhla při koncentraci CD

1 mmol.l⁻¹. Po zvýšení koncentrace na 1,5 mmol.l⁻¹ došlo k rozdělení koeluujících píků omeprazolu a EOF na dva jednotlivé píky. Bez standardů enantiomerů omeprazolu lze obtížně určit, jestli došlo k oddělení omeprazolu a EOF nebo zda-li došlo k separaci enantiomerů, přičemž jeden z enantiomerů koeluuje s EOF, proto jsou v tabulkách uvedeny migrační časy pro všechny píky, i když jsou shodné. Ve všech použitých vlnových délkách byly na elektroferogramech vidět dva podobně vysoké píky. Může to znamenat, že analyt vycházel v zóně s DMF a to způsobilo absorpci obou látek ve všech použitých vlnových délkách. V předchozích separacích vždy absorboval pouze EOF při 202 nm nebo pouze omeprazol při 303 nm, což se projevilo na elektroferogramech v příslušných vlnových délkách. Pokud by zde koeluoval omeprazol a oddělil se od DMF, pak by při 202 nm měl být vidět pouze 1 pík EOF. Vzhledem k tomu, že na elektroferogramech byly píky dva a to i při 303 nm, kde absorbuje pouze omeprazol, byl preferován ten názor, že se enantiomery omeprazolu oddělily.

V tabulkách 16 a 17 vidíme, že při koncentraci CD 1,5 mmol.l⁻¹ pravděpodobně došlo k separaci enantiomerů a že při dalším zvyšování koncentrace došlo k nárůstu efektivní mobility, rozlišení a separačního faktoru α jednotlivých enantiomerů. Nulové

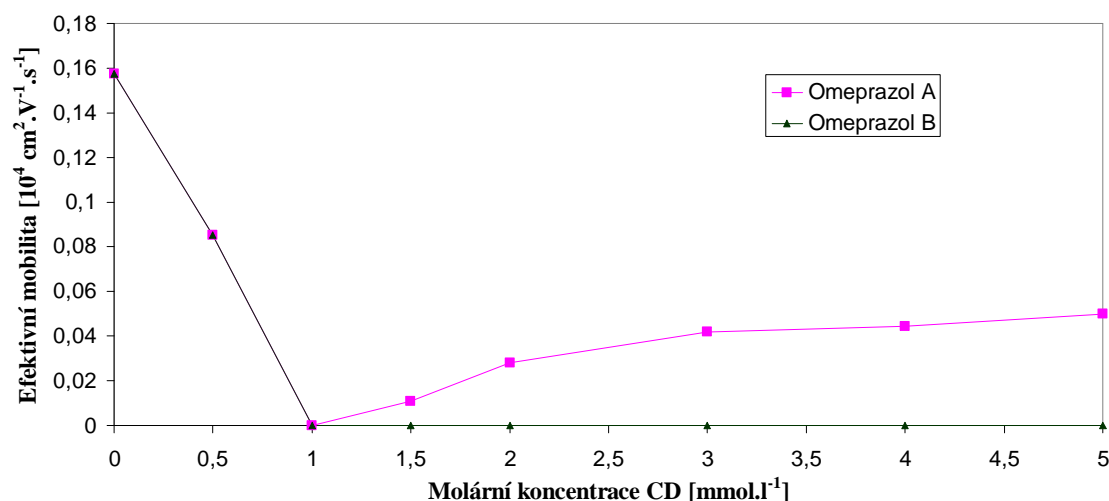
hodnoty píku B jsou přisuzovány možné koeluci s DMF. Kladné hodnoty efektivních mobilit jsou přisuzovány separačnímu pH, ve kterém by omeprazol měl být kladně nabitý.

Tabulka 16. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu ve fosfátovém pufru o pH 5,1 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹ s 2'-O-KM-β-CD

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	t_{mig2} [min]	N₁	N₂	R_{1,2}	α
0	4,495	4,263	4,263	44945	-	-	-
0,5	6,879	6,578	6,578	33387	-	-	-
1,0	7,067	7,067	7,067	30028	-	-	-
1,5	7,553	7,510	7,553	65412	62845	0,45	1,0031
2,0	7,499	7,360	7,499	60536	59524	0,89	1,0189
3,0	7,521	7,352	7,521	54681	48970	1,29	1,0230
4,0	7,779	7,581	7,779	52626	48820	1,45	1,0261
5,0	9,447	9,147	9,447	34051	22987	1,42	1,0330

Tabulka 17. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu ve fosfátovém pufru o pH 5,1 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹ s 2'-O-KM-β-CD

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	μ_{e1} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]
0	0,157	0,010	6,30
0,5	0,085	0,0006	0,86
1,0	0,000	0,000	-
1,5	0,011	0,0002	2,11
2,0	0,028	0,0004	1,60
3,0	0,042	0,003	6,79
4,0	0,044	0,001	2,05
5,0	0,050	0,004	8,78



Obrázek 29: Závislost efektivní mobility omeprazolu na koncentraci 2'-O-KM-β-CD ve fosfátovém pufru o pH 5,1 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹

4.4.3 Separace ve fosfátovém pufru o pH 3,08

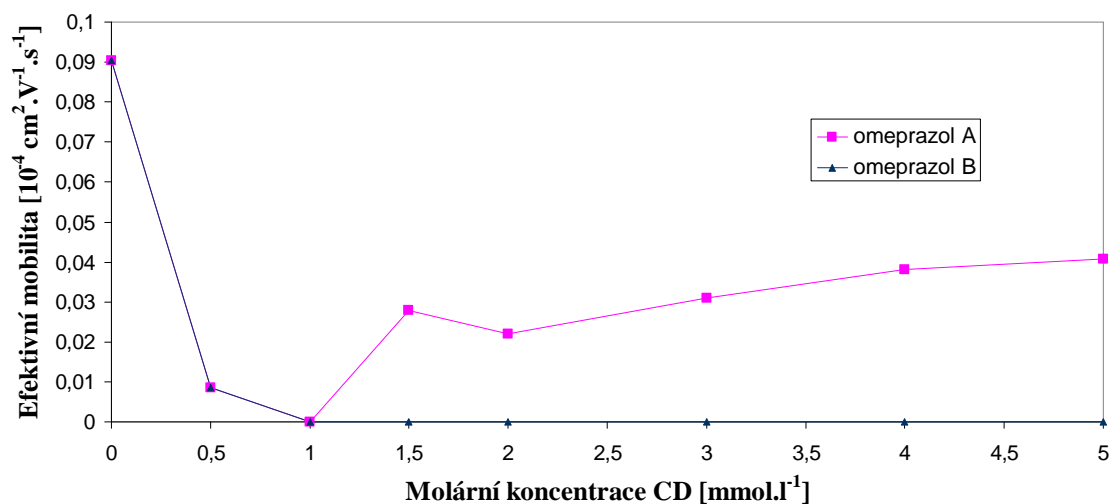
V tomto separačním prostředí došlo k velmi podobné závislosti jako při pH 5,1. Efektivní mobilita omeprazolu klesla při koncentraci 1 mmol.l⁻¹ na nulu a se zvyšující se koncentrací CD rostla efektivní mobilita omeprazolu A. Omeprazol B měl od 1 mmol.l⁻¹ koncentrace CD 1 mmol.l⁻¹ nulovou hodnotu. Závislost efektivní mobility na koncentraci CD je v porovnání s pH 5,1 mnohem méně lineární. Migrační časy píků také postupně rostly s koncentrací CD, ale i zde se vyskytovaly odchylky od nastoleného trendu.

Tabulka 18. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu ve fosfátovém pufru o pH 3,08 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹ s 2'-O-KM-β-CD

c_{CD} [mmol.l ⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	t_{mig2} [min]	N_1	N_2	$R_{1,2}$	α
0	6,714	6,399	6,399	20562	-	-	-
0,5	7,102	7,068	7,068	29654	-	-	-
1,0	7,884	7,884	7,884	15310	-	-	-
1,5	7,958	8,090	7,958	49004	22129	0,73	1,0166
2,0	7,748	7,854	7,748	64162	23213	0,64	1,0137
3,0	7,871	8,020	7,871	44462	30052	0,88	1,0189
4,0	8,008	8,193	8,008	43497	32696	1,17	1,0231
5,0	8,355	8,591	8,355	42356	29034	1,29	1,0282

Tabulka 19. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu ve fosfátovém pufru o pH 3,08 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹ s 2'-O-KM-β-CD

c_{CD} [mmol.l ⁻¹]	μ_{e1} [10 ⁻⁴ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]	SD [10 ⁻⁴ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]	RSD [%]
0	0,090	0,005	5,78
0,5	0,008	0,001	14,12
1,0	0,000	0,000	-
1,5	0,028	0,002	5,75
2,0	0,022	0,002	10,68
3,0	0,031	0,003	11,06
4,0	0,038	0,001	3,84
5,0	0,041	0,002	5,48



Obrázek 30: Závislost efektivní mobility omeprazolu na koncentraci 2'-O-KM-β-CD ve fosfátovém pufru o pH 3,08 a koncentraci 40 mmol.l⁻¹

4.5 Separace enantiomerů omeprazolu pomocí PEMEDA-α-CD

Dichlorid mono-6-deoxy-6-N,N,N',N',N'-pentamethylethylendiammoniocyklo-maltohexaosy (PEMEDA-α-CD) má permanentně kladný náboj a kvůli ionizaci omeprazolu byl pro separaci zvolen zásaditý pufr, kde byl omeprazol nabitý záporně.

Hlavním důvodem pro použití zásaditých pufrů mělo být usnadnění vzniku inkluzního komplexu omeprazolu s cyklodextrínem, podpořený elektrostatickou interakcí.

4.5.1 Separace v borátovém pufru o pH 9,44

V tomto pufru nedošlo k separaci jednotlivých enantiomerů omeprazolu, i přes to, že PEMEDA- α -CD je kladně nabitý a vznik inkluzního komplexu tím mohl být usnadněn. Jednou z příčin může být rozměr molekuly omeprazolu, která pro svou velikost nemůže tvořit inkluzní komplex s α -cyklodextrínem.

Migrační čas se s rostoucí koncentrací CD znatelně prodlužoval, až na výjimku při koncentraci CD 2 mmol.l⁻¹. V této koncentraci došlo k prudkému poklesu migračního času omeprazolu, k zúžení obou píků (více u píku omeprazolu) a k poklesu efektivní mobility, což můžeme sledovat v tabulce 20 a 21 a na obrázku 31. Zúžení píků se promítlo i v počtu teoretických pater, kde došlo ke skokovému nárůstu hodnoty. Při zvýšení koncentrace na 2,5 mmol.l⁻¹ hodnota migračního času omeprazolu opět vzrostla, efektivní mobilita se zvýšila a počet teoretických pater prudce klesl. Na obrázku 31 je graficky znázorněný pokles efektivní mobility v závislosti na koncentraci CD. Na obrázku 32 je elektroferogram, kde vidíme, že při vlnové délce 240 nm absorbuje jak omeprazol, tak i dimethylformamid.

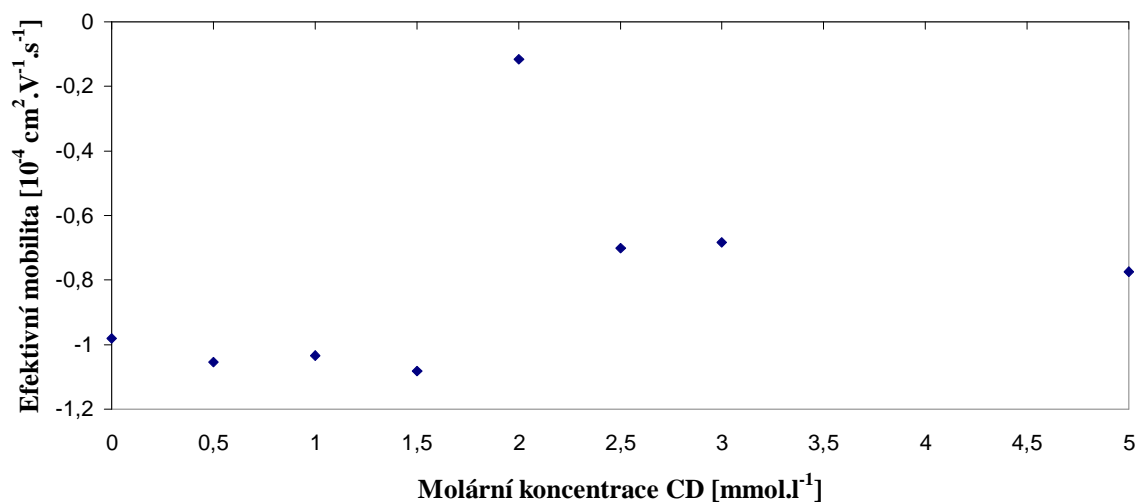
Při koncentraci 5 mmol.l⁻¹ došlo také k prudkému nárůstu N a navíc migrační čas omeprazolu byl přibližně 28 minut, což je prudký nárůst vzhledem k předchozím hodnotám.

Tabulka 20. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v různých koncentracích PEMEDA- α -CD v borátovém pufru o pH = 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹.

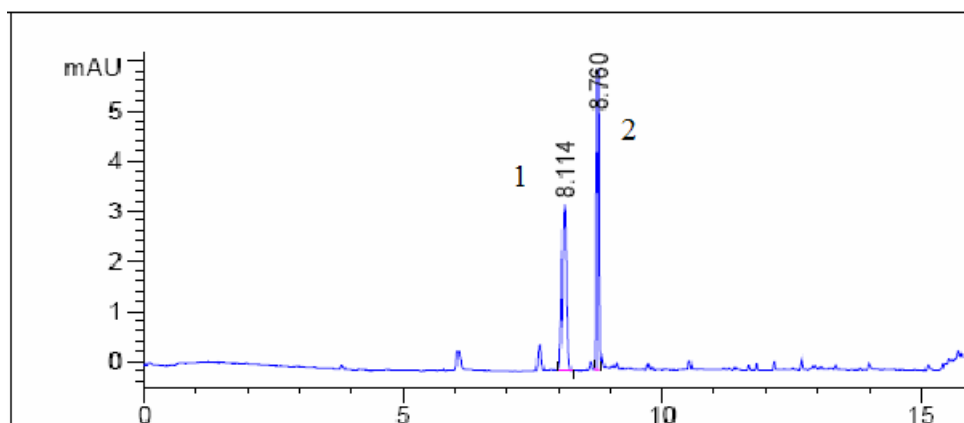
c_{CD} [mmol.l⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	N₁	R_{1,2}	α
0	2,523	3,118	28511	-	-
0,5	7,011	16,098	36754	-	-
1,0	8,185	23,597	9372	-	-
1,5	7,481	19,411	35257	-	-
2,0	8,106	8,743	207319	-	-
2,5	8,127	14,505	5118	-	-
3,0	8,603	15,788	10574	-	-
5,0	10,490	28,165	727697	-	-

Tabulka 21. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu v různých koncentracích PEMEDA- α -CD v borátovém pufru o pH = 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	μ_{e1} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]
0	-0,980	0,051	5,18
0,5	-1,054	0,088	8,32
1,0	-1,033	0,049	4,79
1,5	-1,082	0,083	7,73
2,0	-0,116	0,005	4,04
2,5	-0,700	0,013	1,93
3,0	-0,684	0,008	1,21
5,0	-0,774	0,015	1,91



Obrázek 31: Závislost efektivní mobility omeprazolu na koncentraci PEMEDA- α -CD v borátovém pufru o pH = 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹.



Obrázek 32: Elektroferogram omeprazolu v borátovém pufru, pH = 9,44, $c_{\text{PEMEDA-}\alpha\text{-CD}} = 2 \text{ mmol.l}^{-1}$, $c_{\text{omeprazol}} = 0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$, $\lambda_{\text{detektor}} = 240,4 \text{ nm}$, 1- DMF, 2- omerazol

4.5.2 Separace ve fosfátovém pufru o pH 11,1

V tomto separačním systému nedošlo k rozdělení enantiomerů omeprazolu, stejně jako tomu bylo v borátovém pufru (kapitola 4.5.1). Důvodem byl zřejmě stejný problém, tedy to, že molekula omeprazolu je příliš velká na to, aby mohla s α -CD tvořit inkluzní komplex. V tomto pufru došlo, podobně jako v borátovém, ke snížení mobility v určité koncentraci CD ($1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$). Zde se to však neprojevilo prudkým poklesem migračních časů. Došlo k znatelnému zúžení píku omeprazolu a k mírnému poklesu migračního času. Efektivní mobilita neklesla tak strmě, jako v pH = 9,44. V tabulce 5 můžeme sledovat průběh změny migračních časů. V koncentraci CD $1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ došlo k dříve zmíněnému poklesu efektivní mobility (obrázek 33 a tabulka 23) a zúžení základny píku omeprazolu (obrázek 34), což se projevilo prudkým nárůstem počtu teoretických pater (tabulka 22).

Tabulka 22. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v různých koncentracích PEMEDA- α -CD ve fosfátovém pufru o pH = 11,1 a koncentraci 4 mmol.l^{-1}

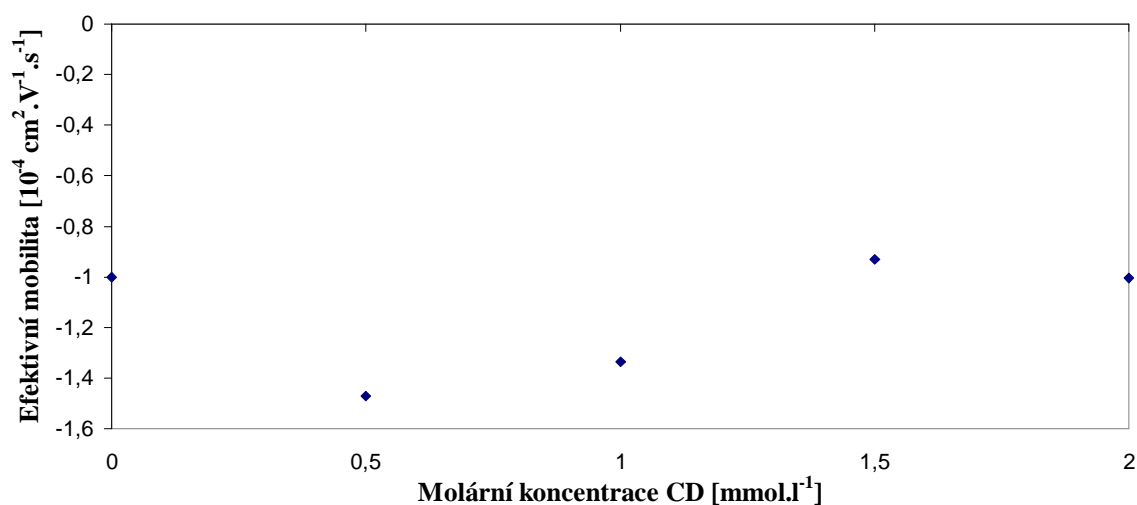
c_{CD} [mmol.l ⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	N_1	$R_{1,2}$	α
0	5,080	8,374	63179	-	-
0,5	5,815	17,141	7182	-	-
1,0	6,843	23,395	16225	-	-
1,5	7,955	18,565	1159744	-	-
2,0	8,106	21,887	62358	-	-

Tabulka 23. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu v různých koncentracích PEMEDA- α -CD ve fosfátovém pufru o pH = 11,1 a koncentraci 4 mmol.l⁻¹

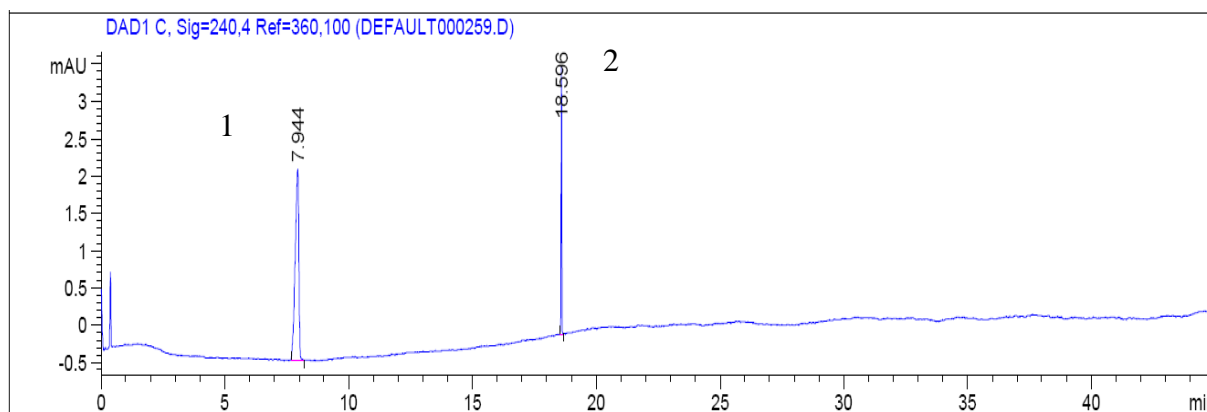
c_{CD} [mmol.l ⁻¹]	μ_{e1} [10 ⁻⁴ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]	SD [10 ⁻⁴ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]	RSD [%]
0	-1,002	0,005	0,46
0,5	-1,470	0,030	2,08
1,0	-1,337	0,015	1,10
1,5	-0,929	0,003	0,33
2,0	-1,005	0,001	0,11

Při porovnání RSD v tabulce 23 s tabulkou 21, můžeme tvrdit, že hodnoty RSD ve fosfátovém pufru jsou nižší oproti hodnotám v borátovém pufru (tabulka 21).

Hodnoty efektivních mobilit jsou celkově nižší, než v borátovém pufru.



Obrázek 33: Závislost efektivní mobility omeprazolu na koncentraci PEMEDA- α -CD ve fosfátovém pufru o pH = 11,1 a koncentraci 4 mmol.l⁻¹



Obrázek 34: Elektroferogram omeprazolu ve fosfátovém pufru, pH = 11,10, $c_{\text{PEMEDA-}\alpha\text{-CD}} = 1,5 \text{ mmol.l}^{-1}$, $c_{\text{omeprazol}} = 0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$, $\lambda_{\text{detektor}} = 240,4 \text{ nm}$, 1- DMF, 2- omeprazol

4.6 Separace enantiomerů omeprazolu pomocí PEMEDA- β -CD.

Dichlorid mono-6-deoxy-6-N,N,N',N',N'-pentamethylethylendiammonio-cyklomaltoheptaosy (PEMEDA- β -CD) má permanentně kladný náboj a kvůli ionizaci omeprazolu byl pro separaci zvolen zásaditý pufr, kde byl omeprazol nabitý záporně. Hlavním důvodem pro použití zásaditých pufrů mělo být usnadnění vzniku inkluzního komplexu omeprazolu s cyklodextrínem, podpořený elektrostatickou interakcí.

4.6.1 Separace v borátovém pufru o pH 9,44

V tomto separačním prostředí došlo k separaci jednotlivých enantiomerů omeprazolu. V tabulce 24 je vidět nárůst migračních časů omeprazolu s rostoucí koncentrací CD a zároveň je vidět nárůst počtu teoretických pater. Migrační časy postupně rostou se zvyšující se koncentrací CD, zatímco počet teoretických pater má při použití CD sice vyšší hodnotu, ale neroste pravidelně nebo úměrně s koncentrací.

Rozlišení $R_{1,2}$ roste úměrně s koncentrací CD, až na výjimku u koncentrace 3 mmol.l^{-1} cyklodextrínu. V tabulce 24 vidíme, že počet teoretických pater píku 1 (N_1) postupně nárůstá až do koncentrace 3 mmol.l^{-1} CD. Počet teoretických pater N_2 nejprve roste, ale při koncentraci CD $2,5$ a 3 mmol.l^{-1} dojde k jeho poklesu. S poklesem N_2 může souviset i pokles rozlišení enantiomerů v 3 mmol.l^{-1} CD, protože u píku 2 dochází k většímu rozmytí. U hodnot relativních směrodatných odchylek efektivních mobilit (RSD) v tabulce 25 vidíme přibližně dvojnásobnou hodnotu RSD při koncentraci $2,5 \text{ mmol.l}^{-1}$ CD

oproti ostatním koncentracím CD. Je to způsobeno rozptylem hodnot migračních časů, respektive efektivních mobilit enantiomerů, který může být způsoben systematickou, náhodnou, ale i subjektivní chybou.

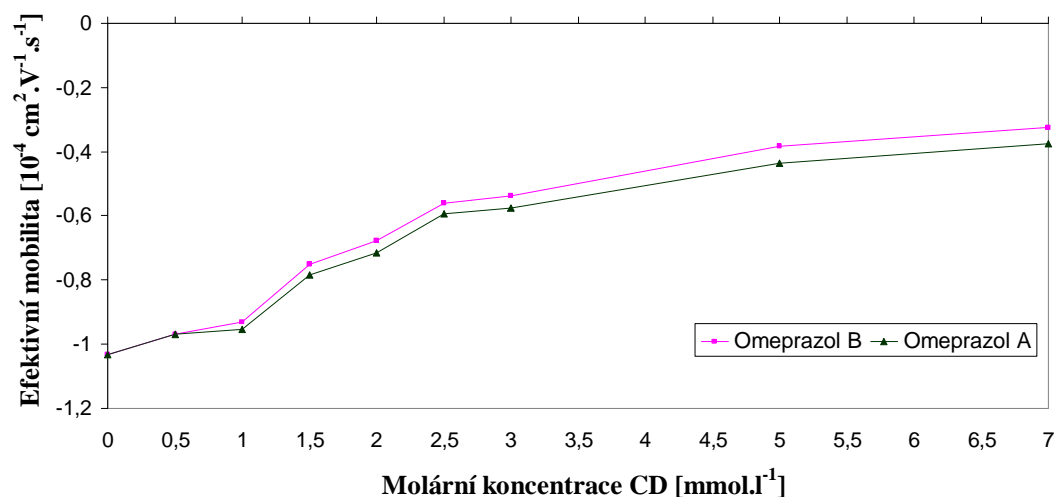
Tabulka 24. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v různých koncentracích PEMEDA- β -CD v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	t_{mig2} [min]	N₁	N₂	R_{1,2}	α
0	2,398	2,966	-	26933	-	-	1,0000
0,5	2,540	3,138	-	31399	-	-	1,0000
1,0	5,216	8,345	8,482	30468	41719	0,75	1,0165
1,5	6,314	9,972	10,238	44324	53468	1,24	1,0267
2,0	6,896	10,800	11,166	52494	63205	1,87	1,0338
2,5	7,570	11,268	11,618	71855	57011	2,21	1,0310
3,0	8,258	12,582	13,072	72133	42844	2,07	1,0389
5,0	10,557	15,364	16,378	52346	61162	3,70	1,0660
7,0	11,962	17,106	18,303	47652	50816	3,75	1,0700

Tabulka 25. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu v různých koncentracích PEMEDA- β -CD v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	μ_{e1} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]	μ_{e2} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]
0	-1,033	0,037	3,574	-	-	-
0,5	-0,970	0,020	2,043	-	-	-
1,0	-0,930	0,014	1,466	-0,954	0,014	1,443
1,5	-0,750	0,61	8,114	-0,784	0,064	8,182
2,0	-0,677	0,057	8,397	-0,716	0,058	8,179
2,5	-0,560	0,075	13,371	-0,594	0,087	14,672
3,0	-0,537	0,029	5,515	-0,577	0,041	7,229
5,0	-0,384	0,017	4,564	-0,436	0,017	4,045
7,0	-0,325	0,012	3,670	-0,375	0,012	3,263

Z obrázku 35 a tabulky 25 vyplývá, že s rostoucí koncentrací CD dochází k poklesu efektivních mobilit enantiomerů omeprazolu, což souvisí s jejich rostoucími migračními časy a zejména s rostoucím rozdílem migračních časů omeprazolu a EOF.



Obrázek 35: Závislost efektivní mobility omeprazolu na koncentraci PEMEDA-β-cyklohextrínu v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹

4.6.2 Separace omeprazolu v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 10 mmol.l⁻¹

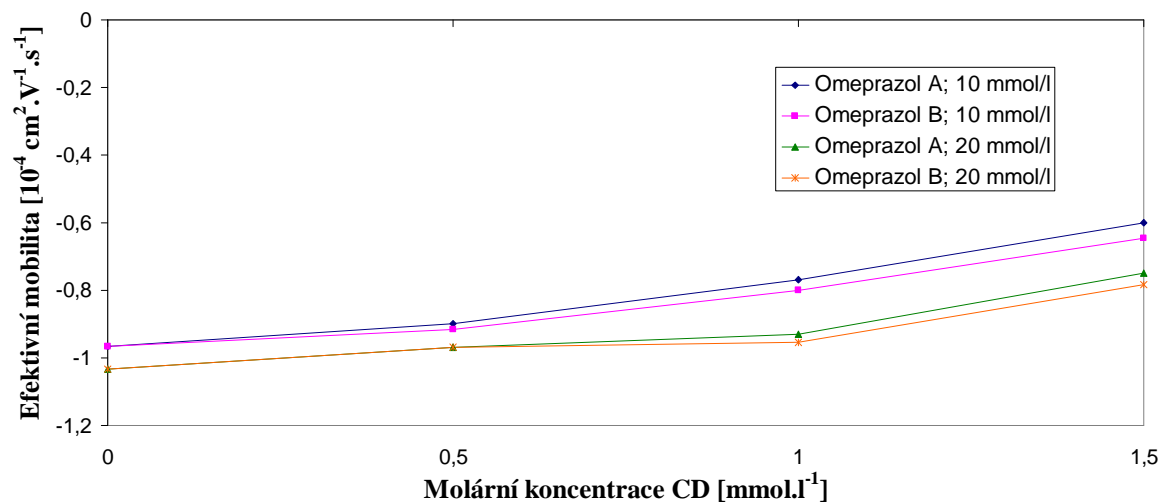
Při porovnání tabulek 26 a 24, tedy při porovnání separace v borátovém pufru o koncentraci 10 mmol.l⁻¹ a 20 mmol.l⁻¹, můžeme sledovat relativně velké změny v rozlišení při stejných koncentracích PEMEDA-β-CD. Zatímco v koncentrovanějším borátovém pufru bylo dosaženo náznaku separace až při koncentraci CD 1 mmol.l⁻¹, zde při koncentraci pufru 10 mmol.l⁻¹ bylo dosaženo náznaku separace už při 0,5 mmol.l⁻¹ CD. Rozlišení při koncentraci CD 1,5 mmol.l⁻¹ v pufru 10 mmol.l⁻¹ bylo téměř dvojnásobné, v porovnání s rozlišením v 20 mmol.l⁻¹ pufru o stejné koncentraci CD. V tabulce 27 jsou uvedeny jednotlivé efektivní mobility a jejich relativní směrodatné odchylky, které jsou odlišné od borátového pufru o koncentraci 20 mmol.l⁻¹. Na obrázku 36 jsou tyto efektivní mobility graficky znázorněné v závislosti na koncentraci. Na první pohled je zřetelný strmější pokles efektivních mobilit u 10 mmol.l⁻¹ borátového pufru. Hodnoty v koncentraci CD 1,5 mmol.l⁻¹ jsou v porovnání s 20 mmol.l⁻¹ borátovým pufrům při stejné koncentraci CD o 0,13.10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹ nižší (obrázek 36).

Tabulka 26. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v různých koncentracích PEMEDA- β -CD v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 10 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	t_{mig2} [min]	N₁	N₂	R_{1,2}	α
0	2,216	2,656	-	12461	-	-	1,0000
0,5	4,957	7,563	7,639	31309	67025	0,52	1,0100
1,0	5,719	8,660	8,847	40932	55267	1,16	1,0216
1,5	7,089	10,555	10,971	51007	63267	2,30	1,0394

Tabulka 27. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu pro různé koncentrace PEMEDA- β -CD v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 10 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	μ_{e1} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]	μ_{e2} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]
0,0	-0,967	0,035	3,55	-	-	-
0,5	-0,899	0,019	2,57	-0,916	0,024	2,65
1,0	-0,768	0,011	1,96	-0,800	0,016	2,02
1,5	-0,599	0,049	5,22	-0,646	0,034	5,26



Obrázek 36: Porovnání efektivních mobilit omeprazolu v různých koncentracích PEMEDA- β -CD v borátovém pufru o koncentraci 10 a 20 mmol.l⁻¹ a pH 9,44.

4.6.3 Separace ve fosfátovém pufru o pH 11,1

V tomto pufru došlo k podobným jevům jako v pufru o pH = 9,44, jak můžeme vidět v tabulce 28. Rozlišení a separační faktor α rostou s rostoucí koncentrací CD, přičemž u koncentrace PEMEDA- β -CD o hodnotě 1,5 mmol.l⁻¹ došlo k mnohem lepší separaci než v předchozím pufru. Už při této koncentraci byla hodnota rozlišení 4,09, což nebylo v pH = 9,44 dosaženo ani při koncentraci CD 7 mmol.l⁻¹. Efektivní mobilita omeprazolu má tendenci klesat s rostoucí koncentrací CD. V tomto pufru bylo měřeno jen do koncentrace 1,5 mmol.l⁻¹ cyklodextrínu. Měření do této hodnoty koncentrace CD bylo zdůvodněno prudkým nárůstem rozlišení a proto další měření nebylo zapotřebí. Navíc dosahovaly hodnoty migračních časů omeprazolu při koncentraci CD 1,5 mmol.l⁻¹ více než 20 minut.

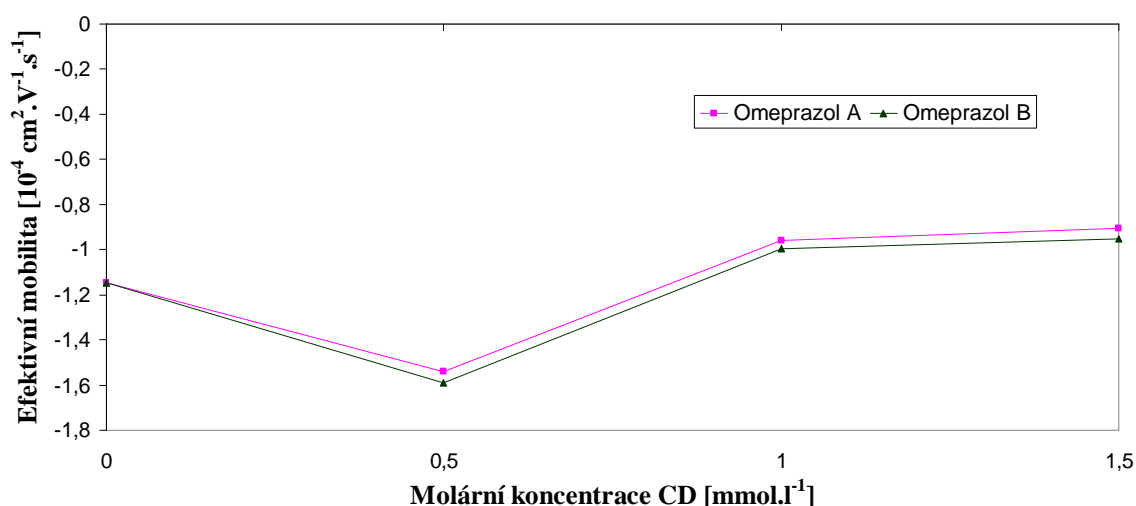
Hodnoty směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek efektivních mobilit pík omeprazolu v tabulce 29 jsou velmi podobné pro oba píky. Největší odchylka byla v pufru s nulovou koncentrací cyklodextrínu, i když se nijak zásadně nelišila od odchylky pro 1,5 mmol.l⁻¹ CD.

Tabulka 28. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v různých koncentracích PEMEDA- β -CD ve fosfátovém pufru o pH 11,1 a koncentraci 4 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l ⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	t_{mig2} [min]	N_1	N_2	$R_{1,2}$	α
0	3,710	5,498	-	22775	-	0	1,0000
0,5	3,510	6,026	6,165	33503	31988	1,06	1,0231
1,0	7,865	18,835	19,844	50292	60670	3,06	1,0536
1,5	8,265	19,655	21,126	49976	57962	4,29	1,0748

Tabulka 29. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu v různých koncentracích PEMEDA- β -CD ve fosfátovém pufru pH 11,1 a koncentraci 4 mmol.l⁻¹

c_{CD} [mmol.l ⁻¹]	μ_{e1} [10 ⁻⁴ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]	SD [10 ⁻⁴ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]	RSD [%]	μ_{e2} [10 ⁻⁴ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]	SD [10 ⁻⁴ cm ² .V ⁻¹ .s ⁻¹]	RSD [%]
0	-1,147	0,136	11,89	-1,147	-	-
0,5	-1,542	0,080	5,23	-1,590	0,087	5,45
1,0	-0,959	0,044	4,59	-0,994	0,045	4,52
1,5	-0,907	0,097	10,7	-0,953	0,107	11,3



Obrázek 37: Závislost efektivní mobility omeprazolu na koncentraci PEMEDA-β-cyklodextrínu ve fosfátovém pufru o pH 11,1 a koncentraci 4 mmol.l⁻¹.

4.6.4 Separace Helicidu v borátovém pufru o pH 9,44

Omeprazol je v Helicidu ve formě sodné soli, což umožňuje snadné rozpuštění ve vodě. Helicid obsahuje racemický roztok omeprazolu. Pro separaci Helicidu byl zvolen 20 mmol.l⁻¹ borátový pufr místo fosfátového a to hned ze dvou důvodů. Prvním byl ten, že se jednalo o komerční pufr vysoké čistoty, protože nebylo jasné, jestli v Helicidu nebudou absorbovat v UV nějaká aditiva. Druhým důvodem byl mírný nárůst rozlišení při separaci a tudíž i snadnější sledování závislosti separace na koncentraci CD.

Helicid byl měřen nejprve v tomto pufru a v době, kdy byly známy výsledky standardního omeprazolu v 10 mmol.l⁻¹ borátového pufru a jeho užití pro Helicid se jevílo vhodnější, byl Helicid příliš dlouho skladován a zdegradoval.

V tabulce 30 můžeme sledovat, že rozlišení enantiomerů omeprazolu v Helicidu při koncentraci CD 2 mmol.l⁻¹ bylo větší (2,93), než při stejné koncentraci CD u standardu omeprazolu, kde bylo rozlišení pouze 1,89 (tabulka 24).

Z tabulky 31 vyplývá, že opakovatelnost výsledků měření je mnohem lepší, než ve standardním omeprazolu, což může být způsobeno lepší rozpustností analytu. Zároveň z obrázku 38 vidíme, že pokles efektivních mobilit je velmi podobný standardnímu omeprazolu, ale zde se nevyskytují žádné nepravidelnosti jako na obrázku 35.

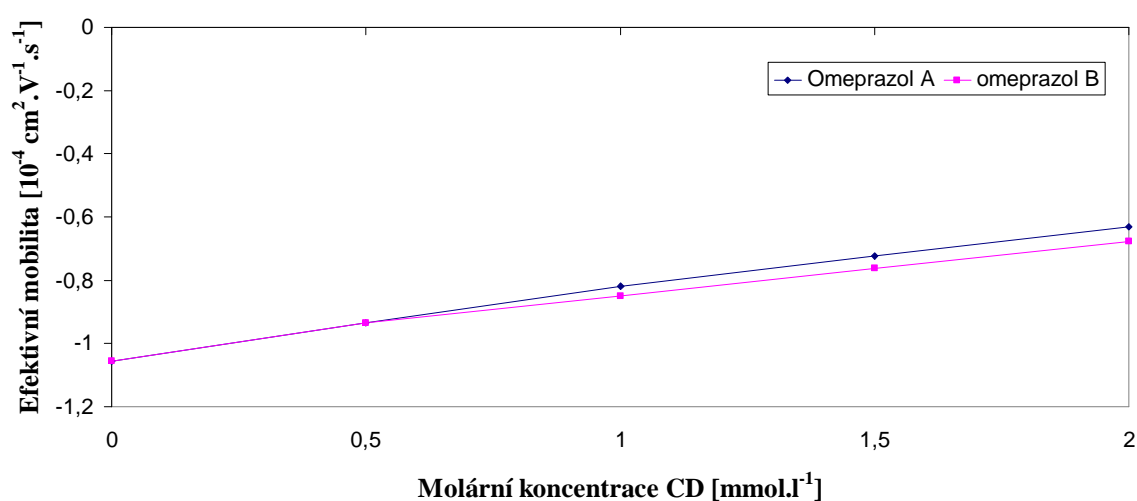
Dalším velkým rozdílem bylo to, že zde došlo k částečné separaci už při koncentraci cyklodextrínu 0,5 mmol.l⁻¹.

Tabulka 30. Průměrné hodnoty migračních časů, počtu teoretických pater, rozlišení a separačního faktoru omeprazolu v Helicidu v různých koncentracích PEMEDA- β -CD v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹

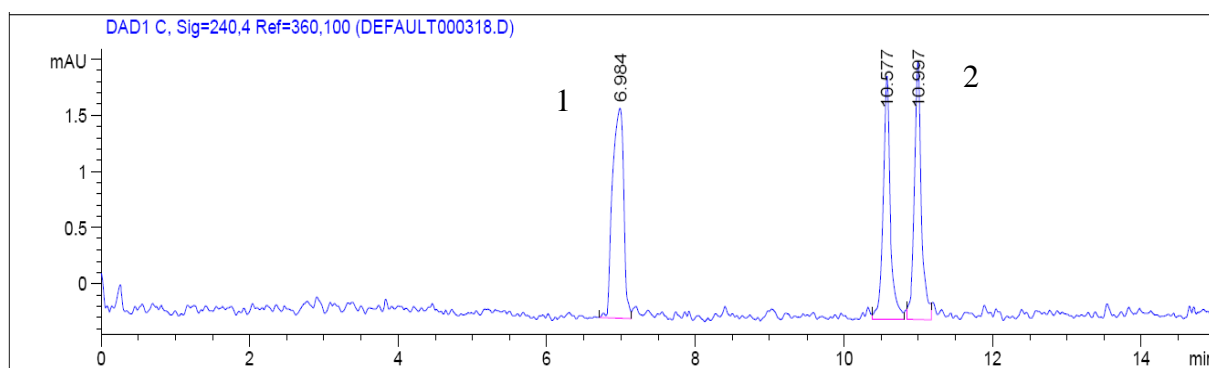
c_{CD} [mmol.l⁻¹]	t_{EOF} [min]	t_{mig1} [min]	t_{mig2} [min]	N₁	N₂	R_{1,2}	α
0	2,394	2,976	-	29837	-	-	1,0000
0,5	5,026	7,893	7,982	106097	106467	0,92	1,0113
1,0	5,805	9,181	9,381	96250	107032	1,72	1,0218
1,5	6,427	10,036	10,354	81296	92818	2,29	1,0317
2,0	6,973	10,577	10,997	86893	93950	2,93	1,0417

Tabulka 31. Hodnoty efektivních mobilit, jejich směrodatných odchylek a relativních směrodatných odchylek omeprazolu v Helicidu v různých koncentracích PEMEDA- β -CD v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹.

c_{CD} [mmol.l⁻¹]	μ_{e1} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]	μ_{e2} [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	SD [10⁻⁴ cm².V⁻¹.s⁻¹]	RSD [%]
0	-1,057	0,010	0,89	-	-	-
0,5	-0,934	0,010	1,01	-0,935	0,010	1,05
1,0	-0,819	0,005	0,60	-0,849	0,007	0,80
1,5	-0,724	0,001	0,12	-0,763	0,001	0,15
2,0	-0,632	0,002	0,34	-0,677	0,003	0,42



Obrázek 38: Závislost efektivní mobility omeprazolu Helicidu na koncentraci PEMEDA- β -cyklodextrínu v borátovém pufru o pH = 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹.



Obrázek 39: Elektroferogram Helicidu v borátovém pufru, pH = 9,44, $c_{\text{PEMEDA-}\beta\text{-CD}} = 2 \text{ mmol.l}^{-1}$, $c_{\text{omeprazol}} = 0,1 \text{ mmol.l}^{-1}$, $\lambda_{\text{detektor}} = 240,4 \text{ nm}$, 1- dimethylforamid, 2- omeprazol

Na obrázku 39 je elektroferogram Helicidu, ve kterém dochází dochází při vlnové délce 240 nm k absorpci omeprazolu i DMF. Rozlišení jednotlivých píků enantiomerů odpovídá hodnotě 2,93.

5 Závěr

Byla provedena separace enantiomerů omeprazolu pomocí mono 2'-, mono 3'- a mono 6'- O – karboxymethyl- β -cyklodextrínů, dichlorid mono-6-deoxy-6-N,N,N',N',N'-pentamethylethylendiammoniocyclomaltoheptaosy (PEMEDA- β -CD) a dichlorid mono-6-deoxy-6-N,N,N',N',N'-pentamethylethylendiammoniocyclomaltohexaosy (PEMEDA- α -CD) v různých pH. Z výsledků vyplývá, že nejhorší pro separaci omeprazolu je mono 3'-O – karboxymethyl- β -cyklodextrín, který v žádném z použitých pH nerozdělil enantiomery a navíc v kyselém pH nebylo možné při vyšších koncentracích interpretovat elektroferogramy.

PEMEDA- α -CD, (pH 9,44 a 11,1), ani mono 6'- O – karboxymethyl- β -cyklodextrín (pH = 9,44, 5,1, 3,08) nerozdělily jednotlivé enantiomery. U PEMEDA- α -CD to mohlo být způsobeno tím, že molekula omeprazolu je příliš velká pro tvorbu inkluzního komplexu s α -CD, zatímco u mono 6'- O – karboxymethyl- β -cyklodextrínu mohla být příčinou jeho derivatizace na 6-OH skupině, která bránila vzniku komplexu.

Mono 2'-O – karboxymethyl- β -cyklodextrín v pH 9,44 nerozdělil enantiomery omeprazolu, ovšem v pH 5,1 a 3,08 je rozdělil. Nejlepší pro separaci omeprazolu v tomto cyklodextrínu se ukázal fosfátový pufr o pH 5,1 a koncentrace CD 5 mmol.l⁻¹, kde bylo dosaženo $R = 1,42$ a $\alpha = 1,0330$.

PEMEDA- β -CD separoval omeprazol v obou použitých pH, tedy v pH 9,44 i 11,1. Ukázal se jako nejlepší pro měření co se týče jeho vlastností při separaci. Nezanášel kapiláru, ani nijak jinak nekomplikoval měření a interpretaci výsledků. Separace byla dosažena už při poměrně nízkých koncentracích CD a jednotlivé píky měly gausovský tvar. Ukázalo se, že nejlepší pro separaci je pufr o pH 11,1, kde bylo dosaženo rozlišení větší než 1,5 už v koncentraci 1 mmol.l⁻¹ CD. Dále byl omeprazol měřen v borátovém pufru o pH 9,44 v koncentraci 0,01 a 0,02 mol.l⁻¹. V nižší koncentraci pufru byl náznak separace patrný už při koncentraci CD 0,5 mmol.l⁻¹, zatímco v 20 mmol.l⁻¹ pufru až při koncentraci 1 mmol.l⁻¹. V 10 mmol.l⁻¹ pufru bylo dosaženo rozlišení větší než 1,5 při koncentraci 1,5 mmol.l⁻¹ CD a v 20 mmol.l⁻¹ borátovém pufru při koncentraci 2 mmol.l⁻¹ CD.

Separace Helicidu byla prováděna v borátovém pufru o pH 9,44 a koncentraci 20 mmol.l⁻¹ a z vypočítaného rozlišení, které mělo hodnotu 1,72 už při koncentraci CD 1

mmol.l⁻¹ je patrné, že separace probíhá snáze, než separace standardního omeprazolu v tom samém pufru.

Z výsledků vyplývá, že omeprazol lze separovat pomocí PEMEDA-β-CD, kde dosáhlo rozlišení v použitých koncentracích vyšších hodnot, než u 2'-O-KM-β-CD, kde se omeprazol také separoval. V ostatních cyklodextrínech nedošlo k separaci enantiomerů a nejhorší využití v použitých separačních podmínkách měl 3'-O-KM-β-CD, kde nebylo možné, při jeho vyšší koncentraci, interpretovat elektroferogramy.

V další práci by bylo vhodné použít PEMEDA-β-CD a vyzkoušet jeho využití v jiných zásaditých separačních pufrech o různých koncentracích a dále vyzkoušet i různé koncentrace CD. Dále by bylo vhodné prozkoumat podrobněji mechanismus působení 2'-O-KM-β-CD, u kterého bylo zjištěno zajímavé chování u chirální separace omeprazolu.

6 Literatura

1. Wang Z., Huang A., Sun Y., *Journal of High Resolution Chromatography*, 19, 697 – 699, 1996
2. Ward T.J., *Analytical Chemistry*, 78, 3947 – 3953, 2006
3. Bonato P. S. , Paías F.O., *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15, 318 – 323, 2004
4. Olsson J., Stegander F., Marlin N., Wan H., Blomberg L.G., *Journal of Chromatography A*, 1129, 291 – 295, 2006
5. Bränström A., Lindberg P., Bergman N., Alminger T., Ankner K., Jurggren U., Lamm B., Nordberg P., Erickson M., Grundevik I., Hagin I., Hoffmann K., Johansson S., Larsson S., Löfberg I., Ohlson K., Persson B., Skanberg I., Tekenbergs – Hjelte L., *Acta Chemica Scandinavica*, 43, 536 – 548, 1989
6. Gyllenhaal O., Vessman J., *Journal of Chromatography*, 628, 275 – 281, 1993
7. Stinson S. C. , *Chemical & Engineering News*, 78, 55, 2000
8. Konev E.A., Khomenko T.M., Kurbakova S.Yu., Komarova N.I., Korchagina D.V., Volcho K.P., Salakhutdinov N.F., Tolstikov A.G., Tolstikov G.A., *Russian Chemical Bulletin*, International Edition, 57, 1680 – 1685, 2008
9. Pavel Anzenbacher, Jaroslav Jezdinský, *Přehledové články Klinické farmakologie*, 17, 148 – 150, 2003
10. Učební text 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy dostupný na URL: http://www.lf3.cuni.cz/miranda2/export/sites/www.lf3.cuni.cz/cs/pracoviste/chemie/vyuka/studijni-materialy/CNSCH1/prednasky/P3_zaklady_organicke_chemie.pdf [cit. 1.5.2010]
11. Souhrn údajů o přípravku, Státní ústav pro kontrolu léčiv, <http://www.sukl.cz/download/spc/SPC72298.doc>, [cit. 1.5.2010]
12. Lapenna D., de Gioia S., Ciofani G., Festi D., Cuccurullo F., *FEBS Letters*, 382, 189 – 192, 1996
13. Stránka informující o vlastnostech léků dostupná na URL: <http://www.drugs.com/mmx/omeprazole.html>, [cit. 1.5.2010]
14. Holt S., Howden C. W., *Digestive Disease and Sciences*, 36, 385 – 393, 1991
15. Olbe L., Carlsson E., Lindberg P., *Nature Review*, 2, 132 – 139, 2003

16. Bezpečnostní list dostupný na URL:
<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9926323>, [cit. 1.5.2010]
17. Tivesten T., Folestad S., Schönbacher V., Svensson K., *Chromatographia Supplement I*, 49, 7 – 11, 1999
18. Gallardo V., López-Viota M., Sierra J., Ruiz M. A., *Pharmaceutical development and Technology*, 14, 516 – 523, 2009
19. Davis F.A., Sheppard A.C., *Tetrahedron Letters*, 45, 5703, 1989
20. Opekar F., text k přednášce, dostupné na URL:
<http://www.natur.cuni.cz/~opekar/analchem/anchem15c.doc>
21. Coufal P., text k přednášce Kapilární a čipové separační techniky, dostupné na URL:
<http://www.natur.cuni.cz/~analchem/katedra.html>, [cit.1.5.2010]
22. Kellner R., Mermut J.M., Otto M., Balcárek M., Widmer M., *Analytical chemistry, A Modern Approach to Analytical Science*, Wiley – VLH, Second edition, 2004
23. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z., skriptum *Základní analytická chemie*, Praha, Karolinum (2003)
24. Coufal P., Capillary Zone Electrophoresis, CZE, dostupné na URL:
<http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/cze.html> [cit.1.5.2010]
25. Beckers J. L., Boček P., *Electrophoresis*, 24, 518 – 535, 2003
26. Lauer H. H., Rozing G. P., *High Performance Capillary Electrophoresis*, A Primer, second completely revised edition, Agilent Technologies, 1.1.2009
27. Sahota R.S., Khaledi M.G., *Analytical Chemistry*, 66, 1141-1146, 1994
28. Geiser L., Veuthey J., *Electrophoresis*, 28, 45-57, 2007
29. Hodačová J., Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Supramolekulární stereochemie – učební text
30. Chankvedatze B., *Journal of chromatography A*, 1168, 45 – 70, 2007,
31. Wang F., Khaledi M.G., *Journal of Chromatography A*, 875, 277 – 293, 2000
32. Gübitz G., Schmid M. G., *Electrophoresis*, 23, 3981 – 3996, 2004
33. Eberle D., Hummel R.P., Kuhn R., *Journal of Chromatography A*, 759, 185 – 192, 1997
34. Singht M, Sharma R., Banerjee U.C., *Biotechnology Advances*, 20, 341 – 359, 2002
35. Beran A., Diplomová práce, Katedra organické a jaderné chemie, PřF UK, školitel: doc. RNDr. Jindřich Jindřich, CSc, 2007
36. Saenger W., Jacob J., Gessler K., Steiner T., Hoffman D., Sanbe H., Koizumi K., Smith S., Takaha T., *Chemical Reviews*, 98, 1787-1802, 1998

37. Špánik I., Krupčík J., *Chemické listy*, 94, 10 – 14, 2000
38. Mosinger J., Tománková V., Němcová I., Zýka J., *Analytical Letters*, 34, 1979 – 2004, 2001
39. Schneiderman E., Stalcup A. M., *Journal of Chromatography B*, 745, 83 – 102, 2000
40. Kraus T., Cyklodextríny, Ústav organické chemie a biochemie AV ČR. Dostupné na URL: http://www.uochb.cas.cz/Zpravy/PostGrad2004/8_Kraus.pdf [cit.6.11.2009]
41. Nevado J. J. B., Peñalvo G.C., Dorado R.M.R., *Analytica Chimica Acta*, 533, 127 – 133, 2005
42. Olsson J., Marlin N.D., Blomberg L. G., *Chromatographia*, 66, 421 – 425, 2007
43. Eberle D., Hummel R. P., Kuhn R., *Journal of Chromatography A*, 759, 185 – 192, 1997
44. Orlando R. M., Bonato P. S., *Journal of Chromatography A*, 795, 227 – 235, 2003
45. Toribio L., Alonso C., Jesús del Nozal M., Bernal L. J., Jiménez J. J., *Journal of Separation Science*, 29, 1363 – 1372, 2006